

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

PAULA REGINA FORTES

Sistemas de análises químicas em fluxo explorando mecanismos de re-
alimentação, calibração multivariada e outras abordagens para melhoria em
desempenho

Piracicaba

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

PAULA REGINA FORTES

Sistemas de análises químicas em fluxo explorando mecanismos de re-
alimentação, calibração multivariada e outras abordagens para melhoria em
desempenho

Tese apresentada ao Centro de Energia
Nuclear na Agricultura da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Área de Concentração: Química na
Agricultura e no Ambiente

Orientador: Prof. Elias Ayres Guidetti
Zagatto

Piracicaba

2010

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Fortes, Paula Regina

Sistemas de análises químicas em fluxo explorando mecanismos de re-alimentação, calibração multivariada e outras abordagens para melhoria em desempenho / Paula Regina Fortes; orientador Elias Ayres Guidetti Zagatto. - - Piracicaba, 2010.

103 p.: fig.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Análise em fluxo contínuo 2. Espectrofotometria 3. Processos de separação 4. Química ambiental 5. Química analítica instrumental 6. Quimiometria I. Título

CDU 543.068.3+543.42

AGRADECIMENTOS

O término do doutoramento representa o resultado da troca de experiências e a conquista dos desafios encontrados ao longo desta jornada. Por isto, se faz necessário agradecer todos aqueles que colaboraram para a conclusão desta Tese.

Em primeiro lugar meus agradecimentos ao Prof. Elias A.G. Zagatto, que além de grande amigo e orientador, sempre foi um incentivador de novos desafios.

À minha família que acredita nos meus sonhos e me faz sorrir todos os dias.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura e à Universidade de São Paulo, que me ofereceram apoio institucional e infra-estrutura necessária para o desenvolvimento das atividades de pesquisa.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelas bolsas de estudo concedidas.

Aos professores do Laboratório de Química Analítica do CENA, Boaventura F. Reis, Francisco J. Krug, Maria Fernanda Giné e José R. Ferreira, pela amizade e discussões científicas.

Aos técnicos e funcionários do Laboratório de Química Analítica Fátima Patreze, Iolanda Rufini, Sheila Wenzel, Otávio Matsumoto e Valdemir Barros pela atenção e os auxílios prestados diariamente. Agradeço também aos funcionários da biblioteca, em especial à Marília e à Renata, pela presteza e atenção.

Aos companheiros de laboratório Milton K. Sasaki e Mário A. Feres pela amizade ao longo destes anos de convivência. Da mesma forma, agradeço aos companheiros de departamento pelos ótimos momentos juntos.

À Universidade Técnica de Berlim (TUB) pelas facilidades e infra-estrutura oferecidas para o desenvolvimento das atividades de pesquisa realizadas durante o período em que realizei doutorado sanduíche.

Ao Dr Wolfgang Frenzel, supervisor em Berlin, que me apresentou novos pontos de vista e novas estratégias para o desenvolvimento de pesquisas.

Aos amigos da TUB Fränze Freigang, Nico Beerbaum, Klio Maniati e Christina Senge que transformaram nossa convivência diária em momentos especiais.

Ao Dr Michael Päch do Instituto Fraunhofer de Pesquisas Aplicadas a Polímeros, pelas discussões científicas.

À Universidade do Porto (UP) pela infra-estrutura durante o período em que realizei doutorado sanduíche, e aos professores José Luis Fontes da Costa Lima e João Luis Machado dos Santos pela atenção e orientação.

Aos companheiros de laboratório da Universidade do Porto, em especial aos amigos André Araujo, Cristina Silvestre, David Ribeiro, Sara Oliveira, pelo fantástico período em que convivemos diariamente.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente auxiliaram na realização e conclusão desta Tese.

- Não faço teias por instinto.
- Então, faz porquê?
- Faço por arte.

Mia Couto, O fio das missangas.

RESUMO

Fortes, P.R. **Sistemas de análises químicas em fluxo explorando mecanismos de re-
alimentação, calibração multivariada e outras abordagens para melhoria em
desempenho.** 2010. 103 f. Tese (doutorado) – Centro de Energia Nuclear na
Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

Estudos foram conduzidos relativamente ao desempenho dos sistemas de análises em fluxo quando configurados como sistemas inteligentes, associados às técnicas de calibração multivariada ou empregando nanocristais como sensibilizadores. Ainda, melhorias relacionadas às modificações dos fluxos foram avaliadas, especialmente no que se refere à diálise em linha.

Neste sentido, foi proposta uma nova estratégia para implementar determinações simultâneas de ferro e vanádio em ligas metálicas envolvendo cinética diferencial. O método baseava-se nas diferentes influências exercidas por Fe^{2+} e por V^{4+} na taxa de oxidação de íons iodeto por íons Cr^{6+} sob condições ácidas. Três diferentes alíquotas de amostra eram inseridas em um fluxo transportador / reagente de KI, confluindo posteriormente com um fluxo de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$. A sobreposição entre as três zonas de amostra estabelecidas resultava em uma zona de amostra complexa com diversos valores de absorbância. Medidas realizadas nos pontos de máximos e mínimos do sinal registrado eram mais precisas e continham informações acerca dos diferentes estágios de desenvolvimento da reação e de diferentes condições de concentrações.

Em outra estratégia, um sistema MPFS inteligente foi proposto para a determinação turbidimétrica sequencial de sulfato e cloreto em águas naturais. Ambos os métodos foram implementados no mesmo módulo de análises, proporcionando facilidades relativas ao: preparo de amostra em linha; adição de íons sulfato ou cloreto ao meio reacional para melhoria das condições de supersaturação; decisão em tempo real acerca da necessidade ou não da próxima análise. Inicialmente, determinava-se a concentração de cloreto presente na amostra, e este resultado era comparado com um valor pré-determinado. Se este fosse superior, a amostra era analisada novamente visando à determinação de sulfato. Caso contrário, uma nova amostra era analisada. A estratégia resultou em aumento da velocidade analítica e em boas figuras de mérito analítico.

Estudos relativos à natureza do fluxo foram conduzidos avaliando-se o desempenho dos fluxos pulsados provenientes de bombas solenóide em relação à eficiência do transporte de massas, dispersão da zona de amostra relacionada com a mudança de sentido do fluxo e eficiência do processo de diálise quando comparados aos fluxos tipicamente laminares. Embora fosse observada a presença de vórtices, o número de Reynolds experimentalmente obtido demonstrou que o fluxo resultante não era turbulento. Porém seu perfil exibia características de mescla turbulenta, melhorando assim o desempenho relativo ao transporte de massas e redução da dispersão da zona de amostra. Entretanto, benefícios relativos a melhorias no processo de diálise foram ausentes devido provavelmente à alta pressão exercida dentro da câmara de diálise, com consequente deformação dos poros da membrana. Nestas situações, um sistema de análises híbrido (com fluxo laminar e mescla turbulenta) seria fortemente recomendado.

Finalmente, a implementação de nanocristais *quantum dots* (QDs) como sensibilizadores em um sistema MPFS envolvendo reação quimioluminescente foi proposta para a determinação de glipizida e gliclazida em formulações farmacêuticas. O método fundamentava-se na oxidação dos íons S^{2-} por Ce^{4+} em meio ácido. Na presença dos analitos, a intensidade da radiação emitida era inibida. A influência do diâmetro médio dos nanocristais foi avaliada, e os critérios utilizados para o dimensionamento do sistema foram a repetibilidade, a reprodutibilidade e a sensibilidade analítica. Os analitos foram quantificados no mesmo módulo de análises, e boas figuras de mérito analítico foram verificadas. Os resultados obtidos se apresentaram concordantes com aqueles obtidos pela Farmacopéia Britânica.

Palavras-chave: Sistemas de análises por injeção em fluxo, Sistemas com multi-impulsão, Sistemas inteligentes, Calibração multivariada, Mescla turbulenta, Diálise, Nanocristais *Quantum Dots*.

ABSTRACT

Fortes, P.R. **Flow systems exploiting feed-back mechanisms, multivariate calibration and other strategies for improving the analytical performance.** 2010. 103 f. Tese (doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

Studies focusing on performance of intelligent analytical flow systems, association with multivariate calibration or use of nanocrystals as sensitizers were carried out. Moreover, improvements related to modifications in flow pattern were evaluated with emphasis to in-line dialysis.

To this end, a strategy for implementing simultaneous determinations of iron and vanadium in alloys relying on differential kinetics was proposed. The method was based on the influence of Fe^{2+} and V^{4+} on the rate of iodide oxidation by Cr^{6+} under acidic conditions. Three different plugs of the sample were sequentially inserted into an acidic KI reagent carrier stream, and a confluent $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ solution was added downstream. Overlap between the established plugs led to a complex sample zone with several regions of maximal and minimal absorbance values. Measurements performed on these regions were more precise and revealed the different degrees of reaction development.

In another strategy, an intelligent MPFS was proposed for sequential turbidimetric determination of sulphate and chloride in natural waters. Both methods were implemented in the same manifold, providing facilities for: in-line sample clean-up; addition of low amounts of sulphate or chloride ions to the reaction medium for improving supersaturation conditions and real-time decision on the need for next assay. The sample was initially run for chloride determination, and the analytical signal was compared with a preset value. If higher, the sample was run again, now for sulphate determination. Otherwise, next sample was assayed. The strategy led to an increased sample throughput and good analytical figures of merit.

Studies focusing on the flow pattern were carried out aiming at the evaluation of the influence of the pulsed flows delivered by solenoid pumps in relation to the efficiency of mass transfer, dispersion related to changes in flow direction of the sample zone and dialysis process as compared with typical laminar flow. Although the establishment of vortices were noted, the experimentally obtained Reynolds number

showed that a turbulent flow was not established. Its pattern exhibited characteristics which improved the performance due to the enhanced radial mass transport inherent in turbulent mixing. Comparatively to laminar flow, beneficial aspects were noted in relation to sample dispersion and mass transfer. In relation to dialysis efficiency however process the benefits were not noted probably due to the high pressure inside the dialysis chamber, with consequent membrane pore deformation. In this situation, a hybrid flow analysis system (with laminar flow and turbulent mixing) might be recommended.

Implementation of quantum dots nanocrystals (QDs NC) as sensitizers in a MPFS with chemiluminometric detection was proposed for the determinations of gliclazide and glipizide in pharmaceutical formulations. The method relied on the oxidation of sulphite by Ce^{4+} in acidic medium and, in the presence of the analytes, the emitted radiation of the $\text{Ce}^{4+}\text{-SO}_3^{2-}\text{-CdTe}$ QDs system was inhibited. Influence of crystal size was investigated, and the criteria for system optimization were the analytical repeatability, reproducibility and sensitivity. Both analytes were quantified in the same manifold, resulting in good analytical figures of merit. The results were in fairly good agreement with those obtained by the British Pharmacopoeia reference method.

Key-words: Flow injection analysis, Multi-pumping flow system, Intelligent systems, Multivariate calibration, Turbulent mixing, Dialysis, Quantum Dots nanocrystals.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.1. Modalidades dos sistemas de análises em fluxo.	2
Quadro 5.1. Características das membranas.	57
Quadro 5.2. Desenvolvimento do processo de diálise.	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Características dos sistemas de análises em fluxo.	3
Figura 1.2. Representação dos sistemas FIA, MCFS e MPFS.	4
Figura 2.1. Condições inerentes às determinações simultâneas em sistemas de análises em fluxo explorando cinética diferencial.	6
Figura 2.2. Informações utilizadas para a construção do modelo matemático.	8
Figura 2.3. Decomposição de matrizes durante o processo de modelagem pelo algoritmo PLS.	9
Figura 2.4. Organização dos dados experimentais na matriz X.	10
Figura 2.5. Diagrama de fluxos para a determinação de ferro e vanádio.	13
Figura 2.6. Gráfico de <i>loading</i> .	18
Figura 3.1. Características dos sistemas inteligentes.	22
Figura 3.2. Operação dos sistemas inteligentes.	23
Figura 3.3. Diagrama de fluxos do sistema para a determinação de cloreto e sulfato.	28
Figura 3.4. Fluxograma.	29
Figura 3.5. Influência da variação da concentração dos reagentes na determinação de cloreto.	32
Figura 3.6. Influência da variação dos principais parâmetros referentes à determinação de sulfato.	35
Figura 4.1. Representação esquemática das velocidades lineares em um fluxo laminar e em um fluxo turbulento.	38
Figura 4.2. Funcionamento da bomba solenóide.	40
Figura 4.3. Esquema da reversão do sentido de deslocamento na zona de amostra.	42
Figura 4.4. Diagramas de fluxos dos sistemas MCFS e MPFS com reversão do sentido de deslocamento da zona de amostra.	43
Figura 4.5. Registro do sinal analítico referente ao sistema MPFS da Figura 4.4 direita.	47
Figura 4.6. Influência da reversão do fluxo no formato do sinal analítico para MCFS e MPFS.	49
Figura 4.7. Influência do volume de amostra nos sistemas MCFS e MPFS.	50
Figura 4.8. Imagens da zona de amostra sob fluxo laminar e fluxo pulsado.	50

Figura 5.1. Representação esquemática do processo de diálise.	56
Figura 5.2. Membrana de celofane utilizada no processo de diálise e unidade de diálise para preparo de amostras.	59
Figura 5.3. Diagramas de fluxos empregados para a avaliação do processo de diálise.	61
Figura 5.4. Influência da vazão do fluxo acceptor na câmara de diálise.	63
Figura 5.5. Influência da presença de modificador químico.	64
Figura 5.6. Comparação entre as curvas analíticas obtida com os sistemas FIA e MPFS.	64
Figura 6.1. Síntese dos CdTe Quantum Dots.	70
Figura 6.2. Quantum Dots.	71
Figura 6.3. Diagrama de fluxos do sistema empregado para a determinação de glipizida e gliclazida.	73
Figura 6.4. Influência das concentrações de Ce^{4+} em R_1 e de SO_3^{2-} em R_2 .	75
Figura 6.5. Influência da vazão.	76
Figura 6.6. Influência da concentração dos QDs A - D.	77
Figura 6.7. Desempenho dos diferentes CdTe QDs.	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Concentrações de ferro e vanádio nas soluções empregadas para a calibração e validação do modelo matemático.	14
Tabela 2.2. Planejamento experimental.	15
Tabela 2.3. Características dos modelos.	17
Tabela 2.4. Característica do sistema de análises proposto para determinação de ferro e vanádio em ligas metálicas.	19
Tabela 2.5. Resultados comparativos.	19
Tabela 3.1. Operação do sistema.	28
Tabela 3.2. Características do sistema de análises proposto para análise de cloreto e sulfato em águas naturais.	36
Tabela 3.3. Resultado das análises de águas naturais.	37
Tabela 4.1. Operação do sistema utilizado para a exploração de fluxo reverso.	45
Tabela 5.1. Tipos de diálise.	54
Tabela 5.2. Porcentagem dos íons fosfato dialisados na ausência de modificador químico.	63
Tabela 6.1. Rotas de síntese dos QDs.	67
Tabela 6.2. Características dos Quantum Dots utilizados.	71
Tabela 6.3. Operação do sistema utilizado para determinação de glipizida e gliclazida.	72
Tabela 6.4. Características do sistema de análises proposto para a determinação de glipizida e gliclazida.	78
Tabela 6.5. Resultado das análises de formulações farmacêuticas.	79

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. DETERMINAÇÕES SIMULTÂNEAS EXPLORANDO CINÉTICA DIFERENCIAL EM SISTEMAS DE ANÁLISES QUÍMICAS EM FLUXO.....	5
2.1. Material e métodos	8
2.1.1. Calibração multivariada.....	8
2.1.2. Materiais	11
2.1.3. Método.....	12
2.1.4. Operação do sistema.....	12
2.1.5. Procedimento experimental	15
2.2. Resultados e discussão	16
2.3. Conclusões.....	20
3. SISTEMAS INTELIGENTES DE ANÁLISES EM FLUXO PARA ANÁLISES SELETORAS	21
3.1. Material e métodos	24
3.1.1. Material.....	24
3.1.2. Método.....	25
3.1.3. Operação do sistema.....	26
3.1.4. Procedimento experimental	29
3.2. Resultados e discussão	30
3.2.1. Determinação turbidimétrica de cloreto	30
3.2.2. Determinação turbidimétrica de sulfato	33
3.2.3. Figuras de mérito analítico	35
3.3. Conclusões.....	37
4. REGIME DE ESCOAMENTO	38
4.1. Material e métodos	41
4.1.1. Materiais	41
4.1.2. Operação do sistema.....	42
4.1.3. Procedimento experimental	43
4.2. Resultados e discussão	46
4.3. Conclusões.....	51
5. DIÁLISE EM SISTEMAS DE ANÁLISES EM FLUXO	53
5.1. Material e métodos	59
5.1.1. Material.....	59

5.1.2. Método.....	60
5.1.3. Operação do sistema.....	60
5.1.4. Procedimento experimental	61
5.2. Resultados e discussão	62
5.3. Conclusões.....	65
6. QUANTUM DOTS NANOCRISTAIS EM SISTEMAS DE ANÁLISES EM FLUXO	66
6.1. Material e método	68
6.1.1. Material.....	68
6.1.2. Síntese de CdTe Quantum Dots	70
6.1.3. Método.....	71
6.1.4. Operação do sistema.....	72
6.1.5. Procedimento experimental	73
6.2. Resultados e discussão	74
6.3. Conclusões.....	79
7. CONCLUSÕES.....	80
REFERÊNCIAS	81

1. INTRODUÇÃO

A automação de procedimentos analíticos tem crescido substancialmente desde a década de setenta, e o seu desenvolvimento tem sido regido pela redução da quantidade de amostra e/ou reagentes e da participação humana durante o processo de análise. Com isto, muitas estratégias analíticas direcionaram-se às tendências de simplificação, miniaturização e confiabilidade metrológica (KELLNER et al., 2004).

A incorporação destas tendências no desenvolvimento da instrumentação analítica tem resultado em sistemas de análises modulares que podem ser operados sob condições de campo e ainda capazes de realizar análises seletoras. O grande desafio, entretanto, consiste em aperfeiçoar os componentes ou dispositivos eletrônicos necessários afim de se garantir a qualidade dos resultados analíticos, tais como *e.g.* confiabilidade, exatidão e precisão.

Neste cenário desenvolveram-se os sistemas de análises em fluxo que, de acordo com a IUPAC (1989), envolvem:

“The introduction of a sample or reagent into a continuous stream by use of a rapid delivery device”

O início do desenvolvimento destes sistemas data dos anos cinquenta, quando um sistema de fluxo segmentado por bolhas de ar (do inglês *Segmented-Flow Analysis*, SFA) envolvendo diálise em linha foi proposto (SKEGGS, 1957). Algum tempo depois, estes sistemas tornaram-se comercialmente disponíveis com a Technicon AutoAnalyzerTM, e se constituíram em um marco nos processos de automação das análises químicas.

Anos mais tarde, algumas vantagens operacionais foram conseguidas inserindo-se a alíquota de amostra em um fluxo transportador não segmentado (NAGY; FEHER; PUNGOR, 1970; STEWART; BEECHER; HARE, 1976), o que levou à concepção e desenvolvimento dos sistemas de análises por injeção em fluxo (do inglês *Flow Injection Analysis*, FIA) (RUZICKA; HANSEN, 1975). Desde então, diversas modalidades foram desenvolvidas, sendo algumas delas apresentadas no Quadro 1.1 e suas características gerais mostradas na Figura 1.1. Nesta Tese, somente foram utilizados os sistemas de análises por injeção em fluxo (FIA), multicomutados (MCFS)

e multi-impulsionados (MPFS). Uma representação genérica destes, bem como algumas características, é mostrada na Figura 1.2.

SFA	Segmented Flow Analysis
CFA	Continuous Flow Analysis
FIA	Flow Injection Analysis
SIA	Sequential Injection Analysis
MCFS	Multi-Commutated Flow Analysis
MPFS	Multi-Pumping Flow Analysis
AIA	All Injection Analysis
LOV	Lab-On-a-Valve
MSFIA	Multi-Syringe Flow Injection Analysis
BIA	Bead Injection Analysis
CIA	Cross Injection Analysis
SIFA	Single Interface Flow Analysis
PAF	Pulsed Accelerated Flow

Quadro 1.1. Modalidades dos sistemas de análises em fluxo.

Embora a unidade de manipulação da amostra, a unidade propulsora dos fluidos e a unidade de detecção sejam distintas entre as diversas modalidades acima mencionadas, seus princípios, potencialidades e limitações tendem a ser similares (Figura 1.1). Isso possibilitou o desenvolvimento de abordagens promissoras como por exemplo, sistemas inteligentes de análises em fluxo; módulos de análises capazes de realizar medidas *off-line*, *in-line* ou *in-situ* e, ainda, sistemas dotados de sensores para monitoramento.

É interessante notar que a utilização de alguns componentes eletrônicos condicionou a associação dos sistemas de análises em fluxo às técnicas quimiométricas. Esta combinação é bastante promissora, pois torna possível, por exemplo, a interpretação de dados contidos em superfícies de resposta quando da utilização de detectores multicanais. Ainda, permite o contorno de problemas analíticos devidos à presença de espécies químicas potencialmente interferentes, viabilizando, assim, a análise multicomponente. Este fato pode ser evidenciado pela crescente aplicação destas técnicas aos sistemas de análises em fluxo (IIDA, 2009).

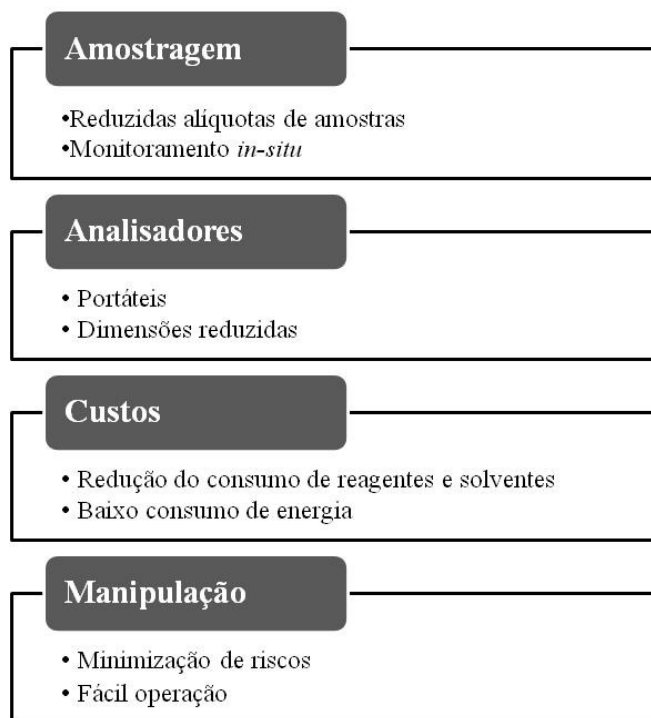


Figura 1.1. Características dos sistemas de análises em fluxo.

Alternativamente, quando se deseja uma discriminação prévia e/ou uma classificação das amostras em tempo real, os sistemas inteligentes¹ de análises em fluxo podem ser facilmente empregados. Estes sistemas são considerados por alguns autores como a revolução da prática da química (HOHNE; PIERCE, 1989), sendo promissores para o controle dos processos químicos. Normalmente exploram mecanismos de realimentação (do inglês *feed-back mechanisms*), e são capazes de modificar a seqüência de amostragem em tempo real e obter informações preliminares que subsidiem a análise principal. Uma das características mais notáveis destes sistemas consiste na integração dos procedimentos analíticos ao processamento do sinal, potencializando sobremaneira a capacidade analítica de um laboratório.

Observa-se que a instrumentação analítica tem permitido uma contínua redução de escala e que muitos componentes eletrônicos, com diversas funções, têm sido incorporados aos módulos de análises. Contudo, faz-se necessário refletir se essas inovações têm aumentado realmente o potencial e a aplicabilidade dos sistemas de análises em fluxo. Nos capítulos que se seguem são apresentados estudos relativos ao desempenho destes sistemas quando associados às técnicas quimiométricas ou configurados como sistemas inteligentes. Aspectos relativos aos benefícios apresentados

¹ A palavra inteligente é aqui utilizada no sentido das seguintes expressões em inglês: *expert*, *smart* e *intelligent*.

quando da modificação da natureza dos fluxos, inversão de sentido dos fluxos ou ainda, o emprego de nanopartículas, também são discutidos.

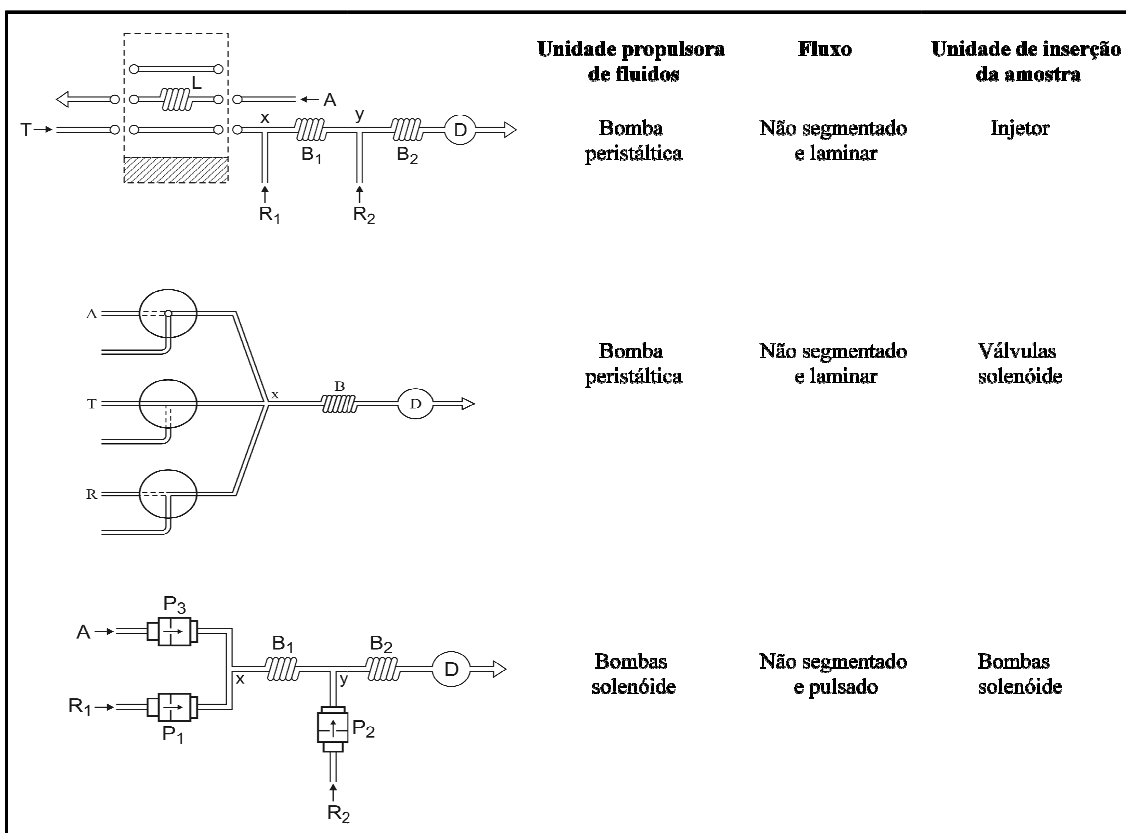


Figura 1.2. Representação dos sistemas FIA (acima), MCFS (centro) e MPFS (abaixo). T: fluxo transportador; L: alça de amostragem; A: amostra; R_i: reagentes; B_i: reatores; V_i: válvulas solenóide; P_i: bombas solenóide; D: detector; x e y: pontos de confluência.

2. DETERMINAÇÕES SIMULTÂNEAS EXPLORANDO CINÉTICA DIFERENCIAL EM SISTEMAS DE ANÁLISES QUÍMICAS EM FLUXO

As características inerentes aos sistemas de análises em fluxo permitem tanto o desenvolvimento de métodos analíticos como os estudos de cinética reacional, pois possibilitam o controle das condições químicas e dos intervalos de tempo disponíveis para o desenvolvimento das reações.

Tendo estas características como base, alguns cientistas (DAHL; ESPERSEN; JENSEN, 1979; PAINTON; MOTTOLA, 1984) as utilizaram para demonstrar a viabilidade de se explorar a cinética diferencial para determinações simultâneas de dois ou mais analitos. O procedimento pioneiro utilizou dois espectrofotômetros posicionados em locais diferentes do percurso analítico. Com isto, obtinham-se dois sinais analíticos, cada um correspondente a um determinado estágio de desenvolvimento da reação. Embora pioneira esta abordagem requeria dois espectrofotômetros, o que a tornava menos adequada para análises em larga escala.

Uma das alternativas propostas para contornar esta desvantagem foi a detecção multi-localizada (ZAGATTO et al., 1992; VENDRAMINI; GRASSI; ZAGATTO, 2006). Esta emprega apenas uma unidade de detecção e efetua o monitoramento de dois lugares distintos do percurso analítico conseguindo, com isso, informações distintas acerca dos estágios de desenvolvimento da reação. Outra abordagem que apresentou bons resultados foi a bifurcação de fluxos (RUZICKA; STEWART; ZAGATTO, 1976; WADA et al., 1986), a qual consiste na divisão da zona de amostra no sistema de análises para tratamentos individualizados, e posterior junção das mesmas imediatamente antes do detector. Obtinham-se assim, diferentes proporções volumétricas, graus de dispersão da amostra e intervalos de tempo disponíveis para o desenvolvimento das reações. Entretanto, este conceito de análises é restrito a aplicações que apresentem respostas distintas para os analitos em estudo, fato que, anos mais tarde, levou Betteridge e colaboradores a desenvolverem um estudo teórico dos sistemas FIA (BETTERIDGE; MARCZEWSKI; WADE, 1984).

Relativamente à análise de misturas binárias, os mesmos autores (BETTERIDGE; FIELDS, 1978) exploraram gradientes de pH formados ao longo da zona da amostra, condicionando assim diferentes interações analito / reagente em uma única análise, uma vez que os gradientes formados são matematicamente previstos

(WADA et al., 1986) e reprodutíveis. Este estudo foi corroborado por Hungerford e Christian (1987) que concluíram que a dispersão do reagente tem um efeito pronunciado na definição da zona de mistura, e que a cinética reacional pode ser modelada desde que a reação ocorra sob condições fixas relativamente ao comprimento dos reatores.

Neste contexto, o emprego de módulos de análises simplificados que utilizam grandes volumes de amostras se tornaram uma alternativa promissora (WHITMAN et al., 1991). A zona de amostra deveria ser suficientemente grande para minimizar a dispersão axial nas porções centrais, obtendo-se assim, diferenças significativas em relação à dispersão e ao tempo de reação nos elementos de fluido referentes ao início e ao final da zona de amostra (HUNGERFORD; CHRISTIAN, 1987). Analogamente, quando se insere de um grande volume de amostra em um fluxo transportador reagente, há a formação de um gradiente de concentração ao longo desta, e cada elemento de fluido da zona de amostra se refere a um diferente grau de desenvolvimento da reação (Figura 2.1). As informações analíticas contidas nestes elementos de fluido podem ser utilizadas para construir modelos matemáticos possibilitando assim a quantificação dois ou mais analitos que apresentem diferentes taxas de reação frente a um mesmo reagente (SAURINA; HERNANDEZ-CASSOU, 2001; FORTES; MENESES; ZAGATTO, 2006).

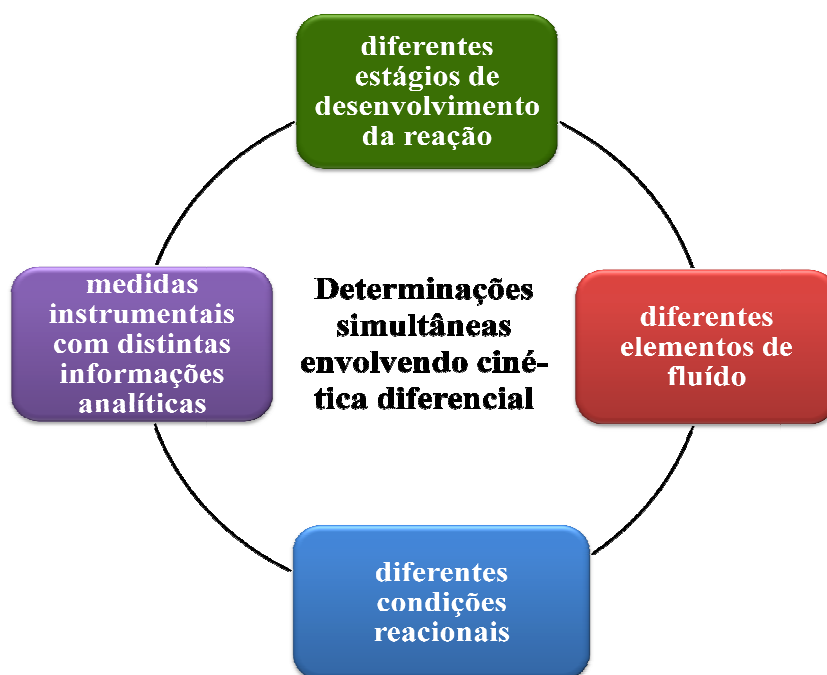


Figura 2.1. Condições inerentes às determinações simultâneas em sistemas de análises em fluxo explorando cinética diferencial.

Nestas estratégias, os sinais analíticos registrados não se apresentam mais com um simples pico, mas como uma curva de resposta complexa (FORTES; MENESES; ZAGATTO, 2006), a qual pode inclusive apresentar diversos valores máximos e mínimos. Estes se referem aos diferentes elementos de fluído associados aos diferentes estágios de desenvolvimento da reação, e para a sua interpretação se faz necessário o uso de técnicas quimiométricas (POPPI 1993). A vantagem da associação destas técnicas aos sistemas de análises em fluxo consiste na expansão de suas potencialidades, uma vez que se torna possível compensar efeitos de espécies químicas interferentes, detectarem amostras anômalas (do inglês *outlier*) e utilizar reagentes pouco seletivos (VALCARCEL; LUQUE DE CASTRO, 1987; WHITMAN et al., 1991).

Esta estratégia foi utilizada por Fortes e colaboradores (2006) para a determinação simultânea de ferro e vanádio em ligas metálicas em um sistema MPFS. Uma zona de amostra suficientemente grande era inserida em um fluxo de iodeto de potássio utilizado como transportador reagente, que posteriormente confluía com dicromato de potássio. Neste contexto, havia carência ou uma proporção limitada de iodeto de potássio nas porções mais centrais da zona de amostra, garantindo assim o registro de diferentes estágios de desenvolvimento da reação envolvida. O sinal analítico registrado era então modelado, permitindo que novas amostras de ligas metálicas fossem analisadas. Entretanto, os autores observaram que grande parte da incerteza dos resultados analíticos era proveniente das informações referentes à “subida” e à “descida” do sinal analítico e das falhas de operação apresentadas pelas bombas solenóide após um período de operação superior a quatro horas.

Buscando contornar esta desvantagem, é relatada, neste capítulo, uma alternativa que consiste em inserir seqüencialmente no módulo de análises três zonas de amostras com volumes diferentes entre si, e substituir as bombas solenóide por uma bomba peristáltica (Figura 2.2). Ainda, diferentemente das estratégias anteriores, consideraram-se apenas as informações contidas nos máximos e nos mínimos do sinal analítico registrado (Figura 2.3), que também se referem a diferentes estágios do desenvolvimento da reação. Pretendeu-se assim sanar as deficiências apresentadas no estudo anterior, obtendo-se um procedimento analítico robusto que representasse uma contribuição significativa para as determinações multicomponentes.



Figura 2.2. Informações utilizadas para a construção do modelo matemático.

O propósito do presente estudo foi a resolução de problemas analíticos e não o desenvolvimento de um novo método. Por isso, o mesmo foi realizado empregando-se um sistema FIA clássico, que é um sistema menos versátil quando comparado aos sistemas MPFS utilizados no estudo anterior (FORTES; MENESES; ZAGATTO, 2006). Como a inovação é válida para fluxos não segmentados, e considerando que os sistemas FIA são mundialmente utilizados pela comunidade científica, espera-se uma maior aceitação da inovação.

2.1. Material e métodos

2.1.1. Calibração multivariada

A Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS, do inglês *Partial Least Squares*) fundamenta-se basicamente na decomposição da matriz $X_{(n,m)}$ (variáveis independentes) e da matriz $Y_{(n,p)}$ (variáveis dependentes) em matrizes menores denominadas *scores*, *loadings* e resíduos estatísticos (GELADI; KOWALSKI, 1986) conforme mostra a Figura 2.3. O produto dos *scores* e *loadings* origina as variáveis latentes (VLs) que, durante o processo de modelagem, executam rotações de forma que a covariância entre as matrizes X e Y sejam maximizadas. O *scores* podem ser definidos como as coordenadas das amostras no novo sistema de coordenadas e, através do seu gráfico, é possível avaliar o perfil do conjunto de amostras. O gráfico dos *loadings* permite identificar e selecionar as variáveis importantes para o processo de modelagem (KELLNER et al., 2004).

$$\begin{matrix} m \\ \boxed{\mathbf{X}} \\ n \end{matrix} = \begin{matrix} a \\ \boxed{\mathbf{T}} \\ n \end{matrix} \begin{matrix} m \\ \boxed{\mathbf{P}} \\ n \end{matrix} + \begin{matrix} m \\ \boxed{\mathbf{E}} \\ n \end{matrix}$$

$$\begin{matrix} p \\ \boxed{\mathbf{Y}} \\ n \end{matrix} = \begin{matrix} a \\ \boxed{\mathbf{U}} \\ n \end{matrix} \begin{matrix} p \\ \boxed{\mathbf{Q}} \\ n \end{matrix} + \begin{matrix} p \\ \boxed{\mathbf{F}} \\ n \end{matrix}$$

Figura 2.3. Decomposição de matrizes durante o processo de modelagem pelo algoritmo PLS. X e Y: matrizes de dados (medidas instrumentais e concentrações correspondentes); T e U: matrizes de *scores*; P e Q: matrizes de *loadings*; E e F: resíduos estatísticos (KELLNER et al., 2004).

A construção de um modelo matemático pode ser dividida em duas etapas:

1. Calibração: etapa onde ocorre o estabelecimento das relações entre os sinais analíticos (valores de absorvância) e as concentrações correspondentes dos analitos presentes nas soluções-padrão. Estes devem representar o conjunto de amostras a serem analisadas, pois as previsões são baseadas em interpolações e não em extrapolações.

2. Validação: etapa onde a otimização das relações que descrevem as amostras em estudo é realizada e a habilidade preditiva do modelo resultante é avaliada. As soluções-padrão que compõem o conjunto de validação devem ser diferentes daquelas utilizadas na etapa de calibração afim de se evitar resultados tendenciosos (POPPI, 1993; WOLD; SJÖSTRÖM, 1998; NI; HUANG; KOKOT, 2003).

Ainda relativamente à construção de um modelo matemático que melhor represente o conjunto de dados inicial, diferentes métodos de validação cruzada podem ser empregados. Neste estudo, empregou-se o método de validação *leave one out* onde uma amostra é retirada do conjunto de calibração e o modelo é construído com as demais. Esta amostra é adicionada novamente ao conjunto inicial, sendo a amostra seguinte retirada, e assim sucessivamente. Este procedimento é repetido até que todas as amostras tenham sido retiradas, obtendo-se assim m modelos com m-1 amostras (MARTENS; NAES, 1989). Ao final, obtém-se o erro padrão das previsões do modelo

(RMSEP, do inglês *root mean standard error of prediction*), mostrado pela Equação 2.1, o qual pode ser utilizado para avaliar o modelo resultante, além de ser considerado como uma estimativa do desvio padrão relativo das previsões (THOMAS, 1994).

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^m (Y_i - \hat{Y}_i)^2}{m}} \quad (\text{Eq. 2.1})$$

onde Y_i : concentrações das soluções-padrão; \hat{Y}_i : concentrações previstas pelo modelo; m : número de amostras.

O modelo matemático construído foi calibrado e validado utilizando-se as medidas de absorvância relacionadas aos máximos e mínimos resultantes das três injeções seqüenciais. Para isto, os dados foram organizados da seguinte forma (Figura 2.4):

- $X_{(n \times m)}$ (matrizes das variáveis independentes): cada linha (n) representa uma amostra, e cada coluna (m) corresponde a uma medida de absorvância (sensor);
- $Y_{(n \times p)}$ (matrizes das variáveis dependentes): cada coluna (p) corresponde às concentrações dos analitos e cada linha (n), à combinação entre elas.

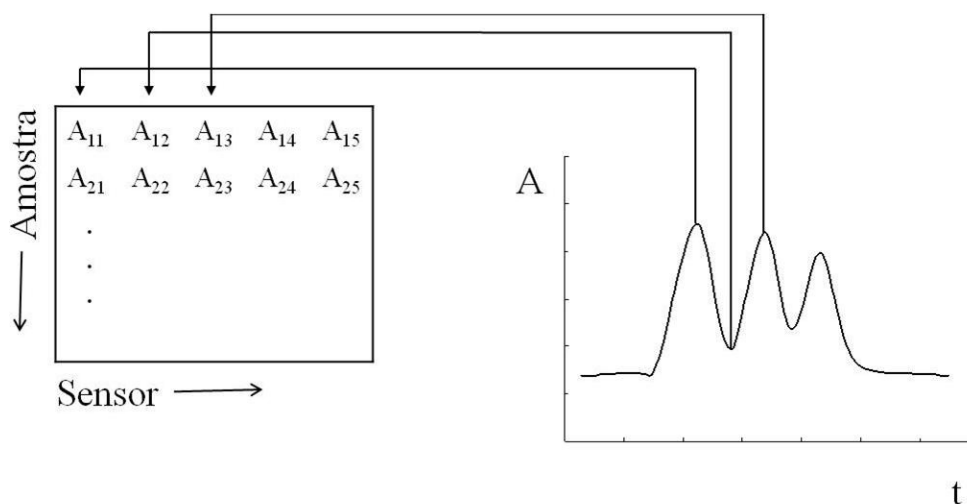


Figura 2.4. Organização dos dados experimentais na matriz X.

Os cálculos envolvidos nas determinações analíticas foram realizados empregando-se *software* MATLAB versão 6.5c (The Math Works, Inc) e o PLS *Toolbox* (Eigenvector Technologies, Inc).

2.1.2. Materiais

Uma bomba peristáltica modelo IPC-08 de fabricação Ismatec, provida de tubos de bombeamento de Tygon com diferentes diâmetros internos, e válvulas solenóide de três vias modelo MTV-3-N1/4UKG (Takasago Electric Inc., Nagoya, Japan) foram utilizadas para a inserção da zona de amostra. Estas eram controladas através da interface PCL-711 (Advantech, Cincinnati, OH, USA).

A unidade de detecção era constituída pelo sistema modelo 3000 de fabricação Fialab (Seattle WA), compreendendo: cubeta de fluxo tipo Z em acrílico com 10 μl de volume interno e 10 mm de passo óptico (RUZICKA, 2000); e espectrofotômetro modelo USB 2000 de fabricação Ocean Optics. O comprimento de onda foi fixado em 420 nm.

Para a confecção das linhas de transmissão e das bobinas (diâmetro de enrolamento = 2 cm), foram utilizados tubos de polietileno de diâmetro interno igual a 0,8 mm.

As soluções utilizadas neste trabalho foram preparadas com água desionizada e reagentes de grau analítico.

As soluções-padrão estoque de ferro e de vanádio (1000 mg L^{-1} Fe ou V) foram preparadas a partir de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ou V_2O_5 , respectivamente. Antes de serem diluídas, quantidades necessárias das soluções eram bombeadas através de uma coluna (i.d. = 3 mm, h = 6 cm) contendo o redutor de Jones para que Fe^{+3} e V^{+5} fossem reduzidos a Fe^{2+} e V^{4+} , respectivamente (WANG; HE, 1993).

As soluções-padrão de trabalho ($8,0 - 10,0 \text{ mg L}^{-1}$ Fe ou $6,0 - 8,0 \text{ mg L}^{-1}$ V) eram preparadas a partir de diluições apropriadas da solução-padrão estoque em $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ HCl. A solução $8,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ KI preparada em $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ HCl era utilizada como fluxo transportador / reagente. A solução $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ preparada em $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ HCl era utilizada como reagente R_2 .

As amostras de ligas metálicas Fe/V eram inicialmente lavadas com $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ HNO_3 , secas e pulverizadas. Aproximadamente 0,1 g de amostra eram então pesadas e colocadas em frascos Erlenmeyer de 250 mL, aos quais eram adicionados 10 mL de *acqua regia* (3 : 1 :: HCl : HNO_3 v/v). Os frascos eram aquecidos até completa dissolução, e resfriados à temperatura ambiente. Em seguida, 5,0 mL de solução de HClO_4 a 70 % (v/v) eram adicionados, sendo os frascos novamente aquecidos até a liberação de fumos brancos. Após resfriamento à temperatura ambiente, os volumes eram completados até 100 mL com água (ASTM, 1991). Anterior às análises, as amostras eram diluídas com solução $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ HCl e reduzidas com o redutor de Jones, análogo às soluções-padrão.

2.1.3. Método

A reação indicadora selecionada para a determinação de ferro e vanádio em ligas metálicas foi a oxidação de íons iodeto por íons dicromato em meio ácido (MOTTOLA; PÉREZ-BENDITO, 1986). Na presença de íons iodeto em excesso, ocorre a formação do complexo $[\text{I}_3]^-$, o qual pode ser monitorado a 420 nm. As espécies químicas tais como Fe^{2+} , V^{4+} , Ti^{3+} e outros catalisam a reação, permitindo então que métodos catalíticos sejam desenvolvidos para as suas determinações.

No presente trabalho, foi explorada a diferença em taxas de oxidação frente a Fe^{2+} e V^{4+} . Neste sentido, foram investigados os principais parâmetros que determinam as condições reacionais relativamente a estas determinações, com o intuito de se obter um procedimento analítico robusto que pudesse representar uma contribuição significativa para as determinações multicomponentes.

2.1.4. Operação do sistema

Para a determinação simultânea de ferro e vanádio, o sistema de análises em fluxo (Figura 2.5) foi projetado de forma ressaltar a discriminação cinética entre os

analitos. Neste sistema, três diferentes zonas de amostras eram inseridas sequencialmente no fluxo transportador / reagente R_1 . Para isso, a válvula V era acionada três vezes, inserindo as diferentes zonas de amostras (S_1 , S_2 , S_3) a dois diferentes intervalos de tempos (Δt_1 e Δt_2). Desta forma, os intervalos de acionamento da válvula V determinavam o volume de amostra e o intervalo de tempo entre cada injeção. Durante o transporte ocorria a dispersão da mesma, formando gradientes de concentração de R_1 ao longo desta. A seguir, o reagente R_2 era adicionado por confluência (ponto x), dando início à reação indicadora. Conseqüentemente, nas regiões onde a razão volumétrica amostra / reagente R_1 era mais favorável, predominava a formação dos íons tri-iodeto.

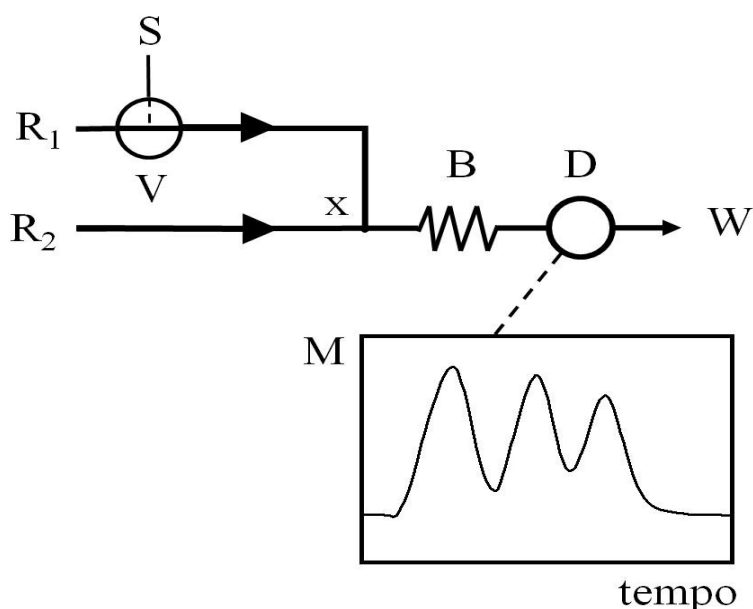


Figura 2.5. Diagrama de fluxos para a determinação de ferro e vanádio. S: amostra; R_1 : fluxo transportador ($8,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ I em $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ HCl a $3,2 \text{ mL min}^{-1}$); R_2 : $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ Cr a $0,6 \text{ mL min}^{-1}$); B: reator (200 cm); x: ponto de confluência; V: válvula solenóide; D: detector (420 nm); W: descarte. Quadro: registro analítico típico [medida (M) vs tempo] a ser utilizado nos cálculos quimiométricos. Vide Figura 2.4.

Cada fração da zona de amostra correspondia a um intervalo de tempo para o desenvolvimento da reação indicadora, a concentrações específicas e a um diferente grau de dispersão. Desta forma, os diferentes elementos de fluido podem ser considerados como diferentes sensores, permitindo a diferenciação entre os analitos cuja presença induzia as diferentes taxas de reação.

Para as análises das ligas metálicas envolvendo o algoritmo PLS, 41 soluções-padrão mistas nos intervalos de $8,0 - 10,0 \text{ mg L}^{-1}$ Fe e de $6,0 - 8,0 \text{ mg L}^{-1}$ V foram preparadas em $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ HCl. Estas soluções foram definidas segundo um

planejamento fatorial com 5 níveis de concentrações para ferro e para vanádio. O conjunto de calibração compreendeu as soluções (1 - 25) especificadas na Tabela 2.1, e para o conjunto de validação foram utilizadas 16 soluções extras (26 - 41) preparadas no intervalo de concentração estabelecido e que não foram utilizadas na construção do modelo.

Tabela 2.1. Concentrações de ferro e vanádio nas soluções empregadas para a calibração e validação do modelo matemático. Dados em mg L⁻¹. As soluções-padrão de 1 a 25 foram utilizados na etapa de calibração e as de 26 a 41, na etapa de validação do modelo.

# Solução	Ferro	Vanádio	# Solução	Ferro	Vanádio
1	8,0	6,0	22	8,5	8,0
2	8,5	6,0	23	9,0	8,0
3	9,0	6,0	24	9,5	8,0
4	9,5	6,0	25	10,0	8,0
5	10,0	6,0	26	8,3	6,3
6	8,0	6,5	27	8,8	6,3
7	8,5	6,5	28	9,3	6,3
8	9,0	6,5	29	9,8	6,3
9	9,5	6,5	30	8,3	6,8
10	10,0	6,5	31	8,8	6,8
11	8,0	7,0	32	9,3	6,8
12	8,5	7,0	33	9,8	6,8
13	9,0	7,0	34	8,3	7,3
14	9,5	7,0	35	8,8	7,3
15	10,0	7,0	36	9,3	7,3
16	8,0	7,5	37	9,8	7,3
17	8,5	7,5	38	8,3	7,8
18	9,0	7,5	39	8,8	7,8
19	9,5	7,5	40	9,3	7,8
20	10,0	7,5	41	9,8	7,8
21	8,0	8,0	-	-	-

2.1.5. Procedimento experimental

Os principais parâmetros empregados neste estudo, tais como acidez do ambiente reacional, concentração dos reagentes, comprimento do reator e vazão total foram os mesmos previamente avaliados e selecionados no estudo anterior (FORTES; MENESES; ZAGATTO, 2006). Entretanto, os efeitos relativos ao volume de amostra (10 - 400 μ l) e aos intervalos de tempo entre as injeções (10 – 18 s) foram avaliados conforme o planejamento experimental mostrado na Tabela 2.2.

Tabela 2.2. Planejamento experimental. S_i : volume de amostra injetado (μ L); Δt_i : intervalo de tempo (s) entre as injeções 1 - 2 e 2 - 3. Números entre parênteses: volumes entre os plugues (μ L), relacionados com os valores de Δt_i .

# Experimento	S_1	S_2	S_3	Δt_1	Δt_2
1	400	300	200	13 (690)	10 (530)
2	300	200	100	13 (690)	10 (530)
3	200	100	80	13 (690)	10 (530)
4	100	80	50	13 (690)	10 (530)
5	80	50	30	13 (690)	10 (530)
6	50	30	10	13 (690)	10 (530)
7	400	300	200	15 (800)	13 (690)
8	300	200	100	15 (800)	13 (690)
9	200	100	80	15 (800)	13 (690)
10	100	80	50	15 (800)	13 (690)
11	80	50	30	15 (800)	13 (690)
12	50	30	10	15 (800)	13 (690)
13	400	300	200	18 (960)	15 (800)
14	300	200	100	18 (960)	15 (800)
15	200	100	80	18 (960)	15 (800)
16	100	80	50	18 (960)	15 (800)
17	80	50	30	18 (960)	15 (800)
18	50	30	10	18 (960)	15 (800)

O critério utilizado para o dimensionamento do volume de amostra e intervalo de tempo foi o modelo matemático resultante, o qual deveria apresentar poder de previsão que resultasse em erros de previsão menores do que 7 %.

Relativamente à etapa de desenvolvimento do modelo, os dados obtidos (matriz **X**) foram centrados na média e validados segundo o *leave one out* com o intuito de se verificar a habilidade para posteriores previsões. O número de variáveis latentes a ser incluído no modelo foi selecionado considerando-se a porcentagem de informação retida (% variância) em cada variável associada ao RMSEP; para isto, construíram-se modelos utilizando de 1 a 5 variáveis latentes de forma a se definir o melhor modelo para cada configuração de sistema estudada e, assim, definir a condição que resultasse em melhor robustez e precisão. A capacidade de previsão dos modelos desenvolvidos foi avaliada comparando-se os resultados obtidos pelo método proposto com aqueles obtidos por ICP-OES. Em vista da baixa variabilidade de ferro e de vanádio nas ligas metálicas, os limites do modelo construído foram estabelecidos de forma que variações nas concentrações destas fossem abrangidas, sendo esta uma garantia adicional de precisão do sistema proposto.

2.2. Resultados e discussão

A formação do complexo tri-iodeto era predominante inicialmente nas extremidades das zonas de amostra, e uma completa sobreposição destas regiões não era totalmente atingida. Após a coalescência parcial das três zonas de amostra, três picos sobrepostos eram registrados (Figura 2.4), refletindo os gradientes de concentração estabelecidos ao longo da de amostra. Os valores máximos e mínimos de absorbância observados evidenciavam a diferença do efeito catalítico de Fe^{2+} e V^{4+} frente à mesma reação indicadora. Este aspecto é fundamental para a discriminação cinética e, portanto, para uma modelagem adequada. Com esta estratégia, as medidas tornaram-se menos afetadas por variações temporais no sistema de fluxo, tornando-o potencialmente mais robusto.

Na Tabela 2.3, pode-se observar que o modelo referente ao experimento 13 (Tabela 2.2), o qual se refere a volumes de amostra 400, 300, 200 μL e intervalos de

tempo 18 e 15 segundos, apresentou-se como o mais adequado para representar o conjunto de dados. Duas variáveis latentes foram capazes de descrever 94,9 % da variância total, e os valores de RMSEP mostraram que o modelo apresentava boa capacidade preditiva, sendo assim, selecionado.

Tabela 2.3. Características dos modelos.

# Experimento	% Informação retida	# VL	RMSEP	
			Ferro	Vanádio
1	97,7	3	0,49	0,58
2	93,9	2	0,79	0,76
3	68,7	1	0,66	0,67
4	47,8	2	1,75	4,17
5	53,3	2	1,24	3,41
6	70,4	2	1,47	2,55
7	90,7	1	0,34	0,66
8	91,9	2	0,45	0,70
9	75,6	1	0,60	0,50
10	52,1	2	1,41	3,26
11	46,6	1	1,61	3,42
12	37,1	1	2,86	2,91
13	94,9	2	0,42	0,52
14	53,1	1	0,40	0,64
15	38,6	1	0,56	0,69
16	48,8	1	1,72	3,23
17	48,7	1	2,05	3,01
18	60,7	4	1,73	3,51

Para menores volumes de amostra e/ou intervalos de tempo mais curtos, a capacidade de previsão dos modelos resultantes era prejudicada, pois o intervalo de tempo disponível para a discriminação cinética não era suficiente. Por outro lado, para maiores valores de S_i e/ou de Δt_i observaram-se separações completas das zonas de amostras. Nesta situação, a principal vantagem desta estratégia qual seja, a exploração das cinco medidas potencialmente mais precisas, era perdida.

Relativamente ao gráfico de *loading* (Figura 2.6) referente ao modelo selecionado (experimento #13), pode-se notar que a primeira variável latente se refere às regiões da zona da amostra caracterizada por valores de absorbâncias máximas e mínimas. As diferenças entre os valores de *loading* relacionados às VL₁ e VL₂ são, então, devidas às diferenças de efeito catalítico dos íons envolvidos. De fato, a influência de V⁴⁺ na taxa de reação é mais significativa em relação ao Fe²⁺.

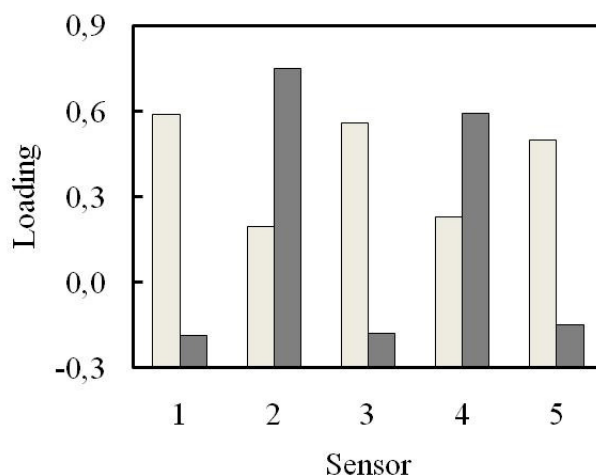


Figura 2.6. Gráfico de *loading*. A figura se refere à primeira (barras brancas) e à segunda (barras cinza) variável latente.

O sistema proposto não apresentou derivas significativas de linha base durante um período de 4 horas. Aproximadamente 25 amostras eram analisadas por hora, significando então 50 determinações. Após a análise de amostras típicas, os desvios-padrão das medidas ($n = 10$) foram estimados como 1,6 % (0,008 A). Outras características inerentes ao sistema de análises por injeção em fluxo proposto são mostradas na Tabela 2.4.

Tabela 2.4. Característica do sistema de análises proposto para determinação de ferro e vanádio em ligas metálicas.

Módulo de análises	Modelo selecionado	Figuras de mérito analítico
R ₁ : 8,0 x 10 ⁻² mol L ⁻¹ I em 0,01 mol L ⁻¹ HCl a 3,2 mL min ⁻¹	2 variáveis latentes	Ausência de derivas de linha base durante um período de 4 horas
R ₂ : 1,0 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹ Cr a 0,6 mL min ⁻¹	ca 95% da informação retida	Velocidade analítica: 25 amostras por hora (50 determinações)
Vazão total: 3,8 mL min ⁻¹	RMSEP: 0,42 (Fe) e 0,52 (V)	d.p.r. medidas: 1,6 % (0,008 A) (n = 10)
Reator: 200 cm		d.p.r. resultados: 1,9% (Fe) e 2,7% (V)
Comprimento de onda: 420 nm		Teste <i>t</i> (95%): 0,049 (Fe) e 0,159 (V); <i>t</i> crítico: 3,18
Δt _i : 18 e 15 s		
ΔS _i : 400, 300 e 200 μL		
Faixas analíticas: 8,0 – 10,0 mg L ⁻¹ Fe e 6,0 – 8,0 mg L ⁻¹ V		

Análise dos resultados obtidos mostrou que o modelo matemático construído apresenta boa capacidade de previsão, resultando em boa exatidão analítica, conforme se depreende da Tabela 2.5.

Tabela 2.5. Resultados comparativos. Concentrações de ferro e de vanádio em ligas metálicas Fe/V (% m/m) determinadas pelo procedimento proposto (FIA) e por ICP-OES (JACINTHO et al., 1985). As incertezas referentes a FIA são (%) baseadas em quatro replicações e as referentes a ICP-OES são tipicamente 3 %.

# Amostra	Fe		V	
	FIA	ICP-OES	FIA	ICP-OES
1	48,1 ± 0,1	47,6	35,1 ± 0,1	33,8
2	42,8 ± 0,2	43,5	34,1 ± 0,2	34,8
3	46,7 ± 0,1	45,5	37,7 ± 0,2	36,6
4	48,9 ± 0,2	49,6	38,7 ± 0,4	38,3

2.3. Conclusões

A possibilidade da concepção de um sistema FIA com injeções seqüenciais de amostra visando à obtenção de dados de forma mais robusta foi demonstrada. As potencialidades, vantagens e limitações dos sistemas foram avaliadas e permitiram se concluir que esta junção possibilita a implementação eficiente de procedimentos analíticos, o que leva a melhoria das figuras de mérito analítico.

O presente trabalho foi desenvolvido baseado nas diferenças das taxas de uma reação indicadora na presença de Fe^{2+} e V^{4+} . Existe a possibilidade de se determinar espécies químicas como Ti^{3+} , Ce^{3+} , Co^{2+} e Sb^{3+} neste sistema, uma vez que estes também influenciam a taxa de desenvolvimento da reação indicadora. Para isto, em princípio, não seria necessário incluir novas etapas no processo de análises, apenas alguns ajustes nas condições reacionais de modo que houvesse discriminação cinética entre eles.

Os resultados obtidos confirmaram a viabilidade de desenvolvimento de módulos de análises simples para determinações multiparamétricas em fluxo.

3. SISTEMAS INTELIGENTES DE ANÁLISES EM FLUXO PARA ANÁLISES SELETORAS

No cenário analítico estabelecido na década de 70, regido pelas tendências em automação, miniaturização e simplificação, desenvolveram-se os chamados sistemas inteligentes. A grande vantagem destes sistemas constituía-se na substituição de procedimentos manuais por procedimentos automáticos sem a intervenção humana. Pretendia-se com isso desenvolver uma sistemática analítica que resultasse no aumento da qualidade dos resultados obtidos, e que fosse economicamente viável e ambientalmente correta (Figura 3.1).

A melhoria em qualidade dos resultados analíticos observada foi fundamental para que estes sistemas se estabelecessem e fossem bem aceitos, propiciando assim o desenvolvimento de linhas de pesquisa baseadas no monitoramento ou amostragem *on-line*, *in-line*, ou ainda, procedimentos não-invasivos (KELLNER et al., 2004).

Muitos destes sistemas empregam mecanismos de realimentação (do inglês *feed back-mechanism*) para classificar e/ou codificar as amostras em tempo real (PERIS et al., 1994), para obter informações preliminares que subsidiassem a análise principal (PERIS et al., 1993), além de desempenhar um importante papel relativo ao tratamento dos dados. Ainda, a maioria dos módulos de análises possui dispositivos operados eletronicamente (*e.g.* válvulas, bombas, detectores) que permitem a adoção de novas estratégias ou seqüências de amostragem e/ou de adição de reagentes (BRANDT; HITZMANN, 1994) sem a necessidade de se modificar o módulo de análises. Os sistemas inteligentes:

- a) necessitam de pouco ou nenhum preparo de amostra;
- b) apresentam alta velocidade analítica;
- c) tendem a fornecer respostas mais qualitativas do que quantitativas;
- d) fornecem informações representativas do conjunto inicial de dados;
- e) permitem decisões imediatas (KELLNER et al., 2004).

Relativamente aos sistemas inteligentes de análises em fluxo, seu emprego tem proporcionado bons resultados, principalmente porque possibilitam que os módulos de análises sejam calibrados e configurados para uma análise específica ou para determinações multiparamétricas, o que os tornam dedicados. Neste sentido os sistemas MPFS se adaptam muito bem às análises de campo, pois são compactos, leves, robustos,

de fácil operação e estáveis. São especialmente atrativos para análises sob condições de campo (quando a metodologia empregada não requer temperatura e umidade controladas), pois requerem baixa energia para sua operação e podem ser operados por diversas horas



Figura 3.1. Características dos sistemas inteligentes.

Os sistemas MPFS podem realizar análises prévias e fornecer dados essenciais, orientando assim o mecanismo de resposta previamente estabelecido (VALCARCEL; CARDENAS; GALEGO, 1999). São então considerados como ferramentas importantes no que se refere às análises seletoras (do inglês *screening analysis*). De maneira geral, as amostras a serem analisadas são selecionadas comparando-se o resultado de uma análise prévia, geralmente uma estimativa de concentração, com um limite previamente determinado especificamente para cada problema analítico, obtendo-se assim uma resposta binária como sim/não, presente/ausente, alto/baixo (Figura 3.2).

Ainda, as análises seletoras em linha podem levar a uma redução significativa no número total de determinações, aumentando a capacidade analítica do laboratório. Este aspecto foi demonstrado em relação à determinação quantitativa de zinco e de fosfato em extratos de solos (GRASSI; DIAS; ZAGATTO, 2004). O número de determinações foi reduzido em cerca de 30 %, uma vez que o zinco somente era determinado quando o fosfato estava presente em concentrações superiores a um limite estabelecido. Outra abordagem interessante consistiu em um módulo de análises que integrava a análise em batelada aos sistemas SIA. Com isto, conseguia-se que as amostras de digeridos de

plantas tivessem um tratamento individualizado, onde o ajuste da acidez era realizado anteriormente as análises (CARNEIRO; HONORATO; ZAGATTO, 2000).

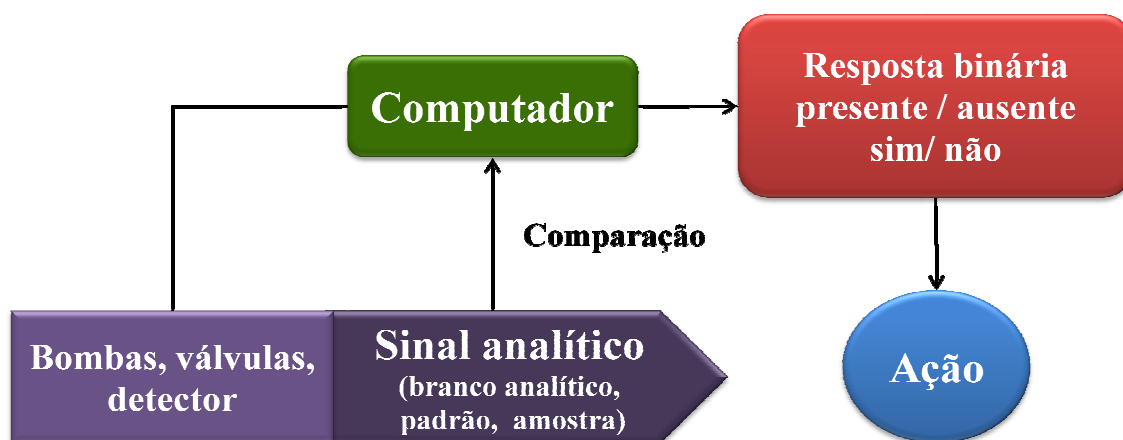


Figura 3.2. Operação dos sistemas inteligentes.

O objetivo desta etapa foi desenvolver um sistema MPFS inteligente para a determinação quantitativa e seqüencial de cloreto e de sulfato em águas naturais, com a seleção de amostras realizada em tempo real. Desta forma, a determinação de sulfato nas amostras estaria condicionada à estimativa em linha da concentração de cloreto. Ambos os métodos foram implementados no mesmo módulo de análises, e a etapa referente ao preparo da amostra foi realizada passando-se a amostra através de uma coluna contendo a resina catiônica com leito fluidizado (RIBEIRO et al., 2006). Os limites de detecção foram melhorados adicionando-se pequenas quantidades de cloreto e sulfato no meio reacional.

3.1. Material e métodos

3.1.1. Material

Todas as soluções foram preparadas com reagentes de grau analítico e água desionizada. Amostras de águas naturais foram coletadas, preservadas com adição de 1,0 mL HNO₃ por litro, armazenadas em frascos de polietileno e filtradas em filtros de membrana de celulose de 0,45 µm (CLESCERI; GREENBERG; ESTON, 1998).

As soluções-padrão estoque (1000 mg L⁻¹ Cl ou SO₄) foram preparadas a partir de NaCl ou (NH₄)₂SO₄. Soluções-padrão mistas (2,0 – 20,0 mg L⁻¹ Cl e SO₄) eram preparadas diariamente em 0,014 mol L⁻¹ HNO₃ a partir de diluições apropriadas.

Os reagentes empregados foram: R₁: 0,01 mol L⁻¹ AgNO₃ + 3,0 mol L⁻¹ HNO₃, preparada semanalmente e armazenada em frascos âmbar; R₂: 8,0 mg L⁻¹ NaCl; R₃: 0,15 mol L⁻¹ Ba(NO₃)₂ + 0,3% v/v Tween-80; R₄: 100 mg L⁻¹ (NH₄)₂SO₄ + 2,0 mol L⁻¹ HNO₃; R₅: 0,3% m/v Na₂EDTA + 0,2 mol L⁻¹ NaOH.

Água desionizada foi utilizada como fluxo transportador (C), e soluções 0,1 mol L⁻¹ NaOH e 1,5 mol L⁻¹ HNO₃ foram empregadas como fluxos eluente (R₆) e condicionante (R₇) da coluna, respectivamente.

A câmara de resina de troca-iônica com leito fluidizado (RIBEIRO et al., 2006) era preparada adicionando-se a resina catiônica Bio-Rex – 70 (Bio-Rad, 50 – 100 *mesh*, forma sódio) em cilindro de vidro com 20 mm de comprimento x 2,9 mm de diâmetro interno. O leito fluidizado consiste na circulação das partículas da resina fluindo juntamente com a solução, proporcionando um maior contato superficial, favorecendo então a troca-iônica. Pequenas quantidades de lã de vidro eram colocadas nas extremidades da coluna com a finalidade de se evitar perdas de resina durante a operação do sistema. O condicionamento desta era realizado bombeando-se uma solução 1,0 mol L⁻¹ HNO₃ (1,0 mL min⁻¹) através dela por aproximadamente 10 minutos.

Os equipamentos empregados consistiram em um analisador FIALab – 3000, incluindo um espectrofotômetro modelo USB 2000 UV-vis da Ocean Optics integrado a uma cubeta de fluxo em Z de acrílico (RUZICKA, 2000), a qual apresentava volume interno de 10 µl e passo óptico de 10 mm.

Bombas solenóide (Bio-Chem Valve Inc., Boonton NJ) com volumes de pulsos de 5, 8, 25 ou 50 μL foram empregadas como unidades propulsoras de fluidos. Válvulas solenóide de três vias (modelo MTV-3-N1/4UKG, Takasago Electric Inc., Nagoya, Japan) foram utilizadas para direcionar os fluxos. As válvulas e as bombas eram controladas através da interface PCL-711 (Advantech, Cincinnati, OH, USA), empregando-se programa computacional Microsoft Quick Basic 5,0.

As linhas de transmissão e as bobinas reacionais (diâmetro de enrolamento = 2 cm) foram feitas com tubos de polietileno com diâmetro interno de 0,8 mm.

3.1.2. Método

O processo de formação de um precipitado pode ser dividido em duas etapas: nucleação e crescimento dos cristais. Durante o período de nucleação há a formação de agregados não visíveis sob condições supersaturadas; estes agregados crescem até o ponto onde a estabilidade do sistema é revertida. As partículas começam então a crescer e se depositar (SALUTSKY; GRACE, 1959). O número de cristais formados varia de acordo com a natureza do precipitado e depende ainda de fatores tais como a concentração das soluções envolvidas e presença de surfactantes, dentre outros (KOLTHOFF et al., 1969).

O método empregado para a determinação de cloreto baseia-se na precipitação dos íons cloreto com íons prata, conforme a Equação 3.1.



O precipitado formado não apresenta tendência em ocluir espécies químicas e, portanto, a presença de substâncias estranhas em geral não leva a erros significativos no resultado da análise. O método pode ser empregado para a determinação de prata ou de cloreto.

Para a determinação de sulfato, explorou-se a precipitação dos íons sulfato com bário (Equação 3.2). A mensuração deste precipitado permite a determinação de bário, de sulfato ou de compostos de enxofre que possam ser quantitativamente oxidados a sulfato (VOGEL, 1992).



Em sistemas de análises em fluxo, normalmente se utiliza a adição de espécies nucleadoras (normalmente a mesma espécie que o analito) afim de se obter condições de supersaturação, com melhorias na taxa de formação dos cristais, melhorando assim a sensibilidade do método e a frequência analítica. Neste estudo, quantidades apropriadas de cloreto e de sulfato foram adicionadas ao meio reacional.

3.1.3. Operação do sistema

O sistema proposto (Figura 3.3) operava com decisões em tempo real baseado em medidas prévias conforme apresentado no fluxograma da Figura 3.4. O modo de operação está sintetizado na Tabela 3.1.

O volume de amostra selecionado era inserido no percurso analítico e processado em triplicata de acordo com o procedimento inerente ao método A, cloreto. O resultado analítico obtido, bem como sua incerteza, era estimado e comparado com um valor pré-estabelecido. Se o resultado fosse superior a este valor, a amostra era inserida novamente, porém processada de acordo com o procedimento estabelecido para o método B, sulfato. Caso contrário, a próxima amostra era analisada de acordo com o método A.

O ciclo analítico iniciava-se com a amostra fluindo através da coluna de troca iônica (bomba P₉ ligada). Espécies potencialmente interferentes que poderiam coprecipitar com sulfato de bário (KOLTHOFF et al., 1969) ou a matéria orgânica que poderia prejudicar a formação da turbidez relativa à formação de cloreto de prata (SARTINI; OLIVEIRA; ZAGATTO, 1997) eram retidas, e a amostra tratada era dirigida ao percurso analítico.

Para a determinação de cloreto, somente as bombas P₁, P₂ e P₈ eram ligadas. A válvula V₁ era acionada durante um intervalo de tempo determinado, proporcional ao volume de amostra a ser inserido no percurso analítico, em termos de número de pulsos e frequência (LIMA et al., 2004), enquanto a válvula V₂ permanecia na posição mostrada na Figura 3.3. Durante a inserção da amostra, a bomba P₈ era desligada. Após a introdução da amostra, a válvula V₁ retornava à posição indicada na Figura 3.1 e a

bomba P_8 era ligada, conduzindo a zona de amostra através do percurso analítico relativo à determinação de cloreto. No ponto de confluência w (Figura 3.3), os reagentes R_1 e R_2 eram adicionados à zona de amostra, formando, então, a turbidez proporcional à concentração de cloreto na amostra, a qual era monitorada a 410 nm e registrada sob a forma de picos. Ao mesmo tempo, as bombas P_6 e P_7 eram acionadas sequencialmente com a finalidade de bombear os reagentes R_6 e R_7 através da coluna, de forma a eluir as espécies interferentes em potencial e realizar a limpeza da coluna, respectivamente.

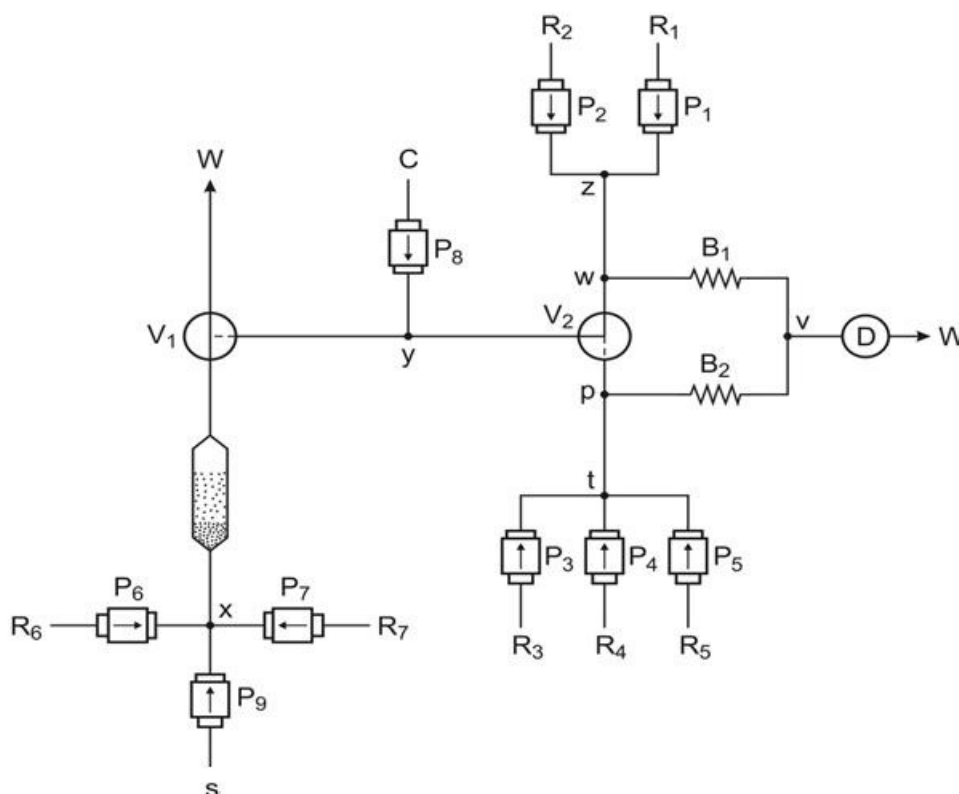


Figura 3.3. Diagrama de fluxos do sistema para a determinação de cloreto e sulfato. P_i : bombas solenóides; V_i : válvulas de três vias; R_1 : $0,01 \text{ mol L}^{-1} \text{ AgNO}_3$ em $3,0 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$ a $1,0 \text{ mL min}^{-1}$; R_2 : $8,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ Cl}$ a $1,0 \text{ mL min}^{-1}$; R_3 : $0,16 \text{ mol L}^{-1} \text{ Ba}$ em $0,3 \text{ \% v/v Tween-80}$ a $0,8 \text{ mL min}^{-1}$; R_4 : $100 \text{ mg L}^{-1} \text{ SO}_4$ em $2,0 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$ a $0,8 \text{ mL min}^{-1}$; R_5 : $0,3 \text{ \% m/v EDTA}$ em $0,2 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$ a $0,8 \text{ mL min}^{-1}$; R_6 : $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$ a $1,2 \text{ mL min}^{-1}$; R_7 : $1,5 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$ a $7,5 \text{ mL min}^{-1}$; C : água a $1,0 \text{ mL min}^{-1}$; B_1 e B_2 : reatores (75 e 250 cm); x , y , z , p , t , v : pontos de confluência; D : detector (410nm), W : descarte.

Com relação à determinação de sulfato, a válvula V_2 era comutada para a posição alternativa, permitindo a introdução da zona de amostra no percurso analítico, a qual confluía com os reagentes R_3 e R_4 no ponto p . A reação se processava no reator B_2 , e a turbidez formada era então monitorada sob as mesmas condições do método proposto por Krug et al. (1983). Analogamente à determinação de cloreto, o número de replicatas variava em função da repetibilidade das medidas. Após esta etapa, a bomba P_5

inseriria o reagente R₅ com a finalidade de limpar o percurso analítico. Testes preliminares revelaram que a solução 0,3 m/v EDTA + 0,2 mol L⁻¹ NaOH era eficiente para a limpeza do percurso analítico relativo à determinação de sulfato.

Tabela 3.1. Operação do sistema. As bombas permaneciam ligadas somente no período referente à sua etapa de operação; números 1 e 2 referentes à posição das válvulas referem-se à posição especificada na Figura 3.3 e à posição alternativa, respectivamente.

Etapa	Operação	Bomba (Volume por pulso)	# Pulsos	Posição das válvulas	
				V ₁	V ₂
1	Amostragem	P ₁ (5μL) + P ₂ (5μL) + P ₈ (8 μL) + P ₉ (8 μL)	100	1	1
2	Introdução da amostra	P ₁ (5μL) + P ₂ (5μL) + P ₉ (8 μL)	20	2	1
3	Reação / limpeza da coluna (fase 1)	P ₁ (5μL) + P ₂ (5μL) + P ₆ (8 μL) + P ₈ (8 μL)	80	1	1
4	Reação / limpeza da coluna (fase 2)	P ₁ (5μL) + P ₂ (5μL) + P ₈ (8 μL) + P ₇ (50 μL)	32	1	1
5	Amostragem	P ₃ (5μL) + P ₄ (5μL) + P ₈ (8 μL) + P ₉ (8 μL)	100	1	2
6	Introdução da amostra	P ₃ (5μL) + P ₄ (5μL) + P ₉ (8 μL)	60	2	2
7	Reação / limpeza da coluna (fase 1)	P ₃ (5μL) + P ₄ (5μL) + P ₆ (8 μL) + P ₈ (8 μL)	80	1	2
8	Limpeza da coluna e percurso analítico (fase 2)	P ₅ (5μL) + P ₇ (50μL) + P ₈ (8 μL)	32	1	2

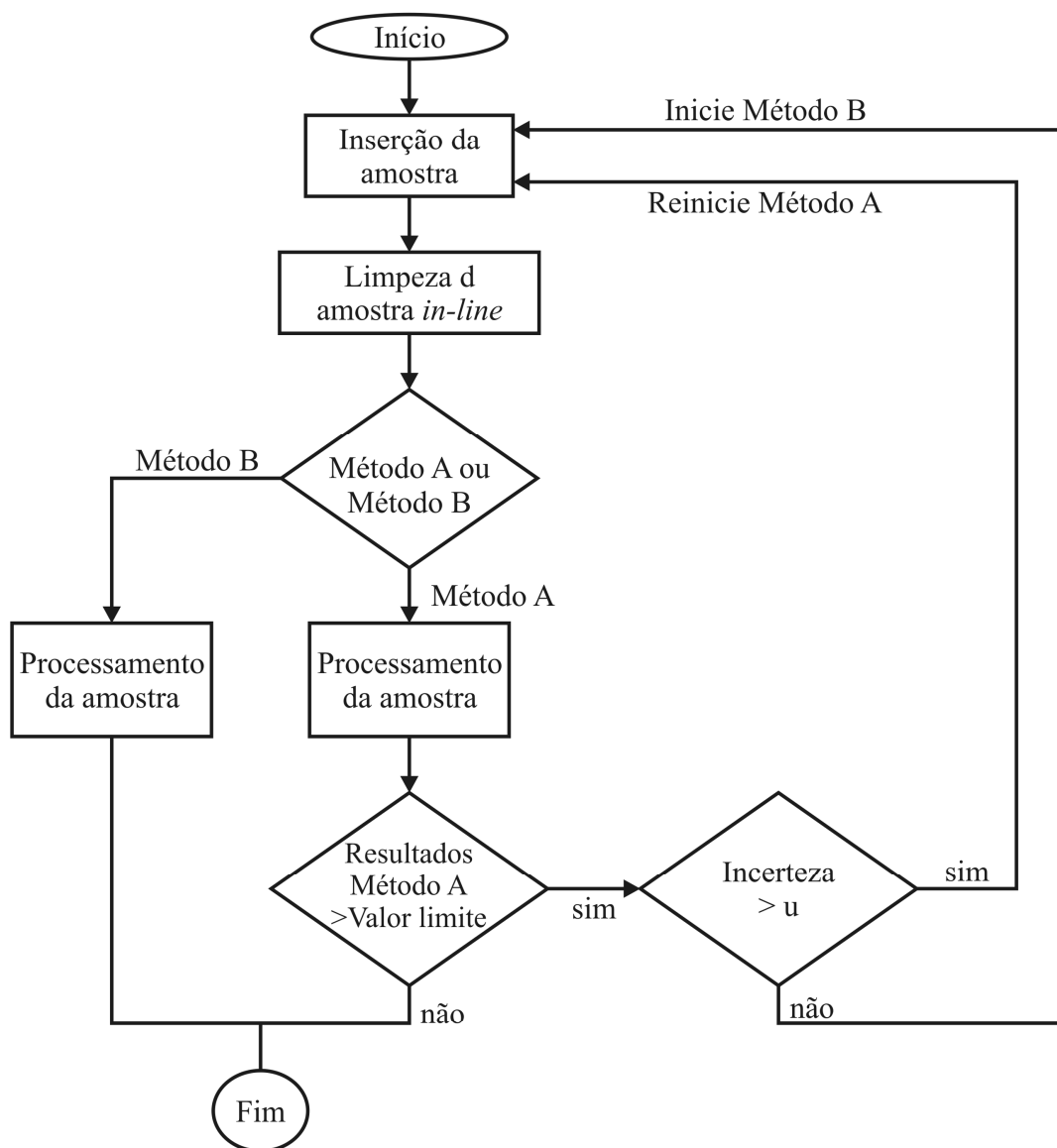


Figura 3.4. Fluxograma. Seqüência lógica do programa de operação do sistema, repetida três ou seis vezes de acordo com o resultado analítico obtido.

3.1.4. Procedimento experimental

Visando a otimização da determinação de cloreto, os principais parâmetros relativos à formação da turbidez foram avaliados. Para isto, investigou-se a influência da acidez do meio reacional, variando-se as concentrações de HNO_3 ($0,0 - 5,0 \text{ mol L}^{-1}$) no reagente R_1 . Concentrações de Ag^+ (reagente R_1) bem como de Cl^- (reagente R_2) foram investigadas nos intervalos de $5,0 \times 10^{-4} - 1,0 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ e de $0,0 - 10,0 \text{ mg L}^{-1}$ respectivamente, variando-se apenas um parâmetro de cada vez. Experimentos

relativos à influência da formação dos cristais e adição de núcleos primários de cloreto de prata no percurso analítico foram conduzidos variando-se o comprimento da linha de transmissão z-w e B_1 entre 10 – 100 cm e 0 - 300 cm, respectivamente. A influência da vazão total do sistema foi investigada entre 2,0 – 5,0 mL min⁻¹. O volume de amostra a ser inserido no percurso analítico foi estudado entre 80 - 240 µL, variando-se o número de pulsos durante a fase de amostragem (10 – 30 pulsos).

Relativamente à determinação de sulfato, avaliou-se a composição do reagente R_3 variando entre 0,12 e 0,30 mol L⁻¹ Ba e 0,1 – 0,3 % (v/v) em Tween-80. A influência da acidez na formação da suspensão de sulfato de bário foi investigada modificando-se as concentrações de HNO₃ entre 0,1 e 2,0 mol L⁻¹ (reagente R_4). A influência da concentração de íons sulfato adicionados (reagente R_4) foi investigada entre 0 e 100 mg L⁻¹. O intervalo de tempo disponível para o desenvolvimento da reação foi estudado variando-se a vazão total entre 2,0 e 5,0 mL min⁻¹. O comprimento do reator B_2 entre 75 e 200 cm e o volume de amostra a ser introduzido no percurso analítico foi estudado entre 320 e 800 µL. Após o dimensionamento do sistema, seu desempenho e as figuras de mérito analítico foram avaliados. A seguir, o sistema foi aplicado a análises em larga escala de águas naturais.

3.2. Resultados e discussão

3.2.1. Determinação turbidimétrica de cloreto

Quando concentrações baixas de ambos os reagentes R_1 e R_2 eram empregadas, a supersaturação necessária para a formação do precipitado não era adequada, resultando em baixa sensibilidade analítica. Por outro lado, o excesso de íons prata no meio reacional levou à formação de complexos solúveis tais como $[Ag_2Cl]^+$ e/ou $[Ag_3Cl]^{2+}$, dentre outros, prejudicando a linearidade da curva analítica.

Aumentando-se a concentração de Ag de $5,0 \times 10^{-4}$ para $5,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ no reagente R_1 , observaram-se melhorias do limite de detecção. Por outro lado, para concentrações superiores a $5,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ uma diminuição em sensibilidade foi observada (Figura 3.5a) devido, provavelmente, à aglutinação das partículas (EWING,

1969), reduzindo a área disponível para o espalhamento (do inglês *scattering*) da radiação incidente. Desta forma, a concentração de Ag^+ no reagente R_1 foi fixada em $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$.

Nos procedimentos turbidimétricos, geralmente se emprega a adição de surfactantes para garantir uma nucleação uniforme e prevenir a deposição do precipitado ao longo do percurso analítico (KRUG, 1984). No sistema proposto para a determinação de cloreto, tanto a ausência como a adição de surfactantes no reagente R_2 levou a resultados semelhantes (Figura 3.5b), evidenciando, portanto que esta adição não era necessária, uma vez que não proporcionava melhorias na sensibilidade analítica.

Relativamente à concentração de cloreto em R_2 , sua adição proporcionou melhoria em sensibilidade analítica, causando um aumento de *ca* 50% na magnitude dos sinais analíticos. Porém, a adição de soluções com concentrações maiores do que $8,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ Cl}$ proporcionou um aumento pronunciado relativo à turbidância da linha base (Figura 3.5c), deteriorando a relação sinal-ruído, além de comprometer a linearidade da curva analítica. Desta forma, a concentração do reagente R_2 foi fixada em $8,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ Cl}$, resultando em uma linha base estável ao nível de $< 0,05$ turbidância.

Outro aspecto importante é a formação relativamente rápida da turbidez. Este fato foi evidenciado pela estabilidade da medida após a parada dos fluxos no instante em que o sinal analítico era máximo. Isto demonstrou que a turbidez era quantitativamente estabelecida durante o intervalo de tempo disponível para o processamento da reação.

A acidez do meio reacional influenciou sobremaneira tanto a sensibilidade como a seletividade do método sendo, neste sentido, um parâmetro importante na otimização do sistema (Figura 3.5d). Na ausência de ácido nítrico em R_2 , os sinais analíticos obtidos eram aproximadamente a metade daqueles obtidos sob condições levemente ácidas, além de serem mais susceptíveis à presença de espécies interferentes em potencial que poderiam formar hidróxidos pouco solúveis. Desta forma, a necessidade de se empregar ácido nítrico se fundamenta na prevenção da precipitação de óxidos, carbonatos ou fosfatos de prata (BACCAN et al., 1979).

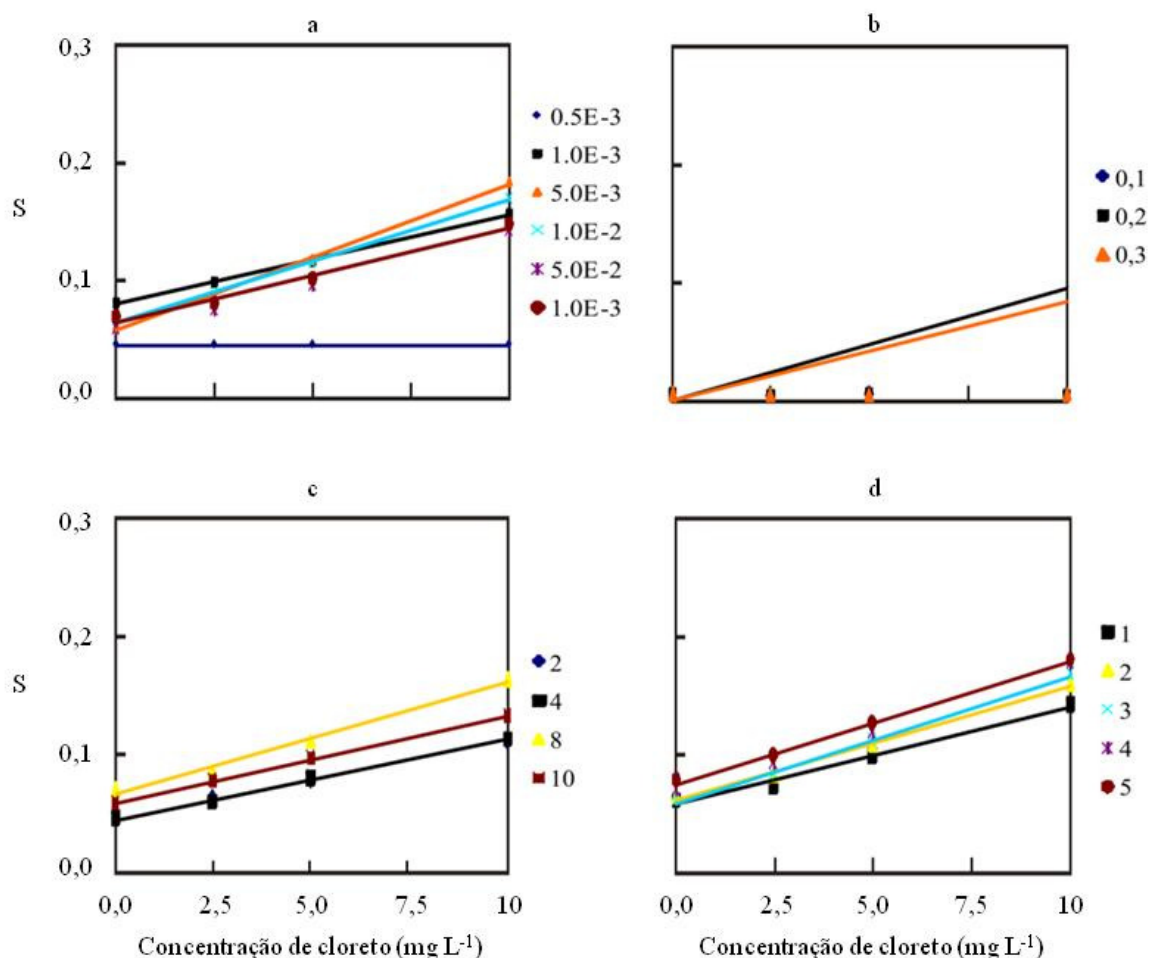


Figura 3.5. Influência da variação da concentração dos reagentes na determinação de cloreto. (a) concentração de Ag^+ ($0,5 \times 10^{-3}$ – $1,0 \times 10^{-2}$ mol L^{-1}); (b) adição de Tween-80 (0,1 – 0,3 % v/v); (c) adição de Cl^- (2,0 – 20,0 mg L^{-1}); (d) concentração de HNO_3 (1,0 – 5,0 mol L^{-1}).

Como compromisso entre sensibilidade, repetibilidade analítica e linearidade da curva analítica, a concentração de 3,0 mol L^{-1} HNO_3 foi selecionada. Isto levou à obtenção de um desvio padrão dos resultados inferior a 2 %. Para concentrações maiores, observou-se um discreto aumento na magnitude dos sinais obtidos com redução da linearidade. Sob a condição selecionada, pequenas variações na acidez da amostra decorrentes da preservação incorreta da mesma, ou ainda, erros de acidificação sob condições de campo não eram relevantes.

A influência do intervalo de tempo disponível para a reação bem como do volume de amostra a ser inserido no sistema foi estudada em termos de números de pulsos por unidade de tempo das bombas solenóide, e as condições de mistura em função do comprimento do reator. A melhor sensibilidade foi observada quando o reator B_1 foi fixado em 75 cm, suficiente para prover boas condições de mistura e completa

formação da turbidez em presença do analito. A vazão total de $2,4 \text{ mL min}^{-1}$ e volume de amostra de $160 \text{ }\mu\text{L}$ foram então selecionados.

Como a taxa de formação dos núcleos primários dos cristais de cloreto de prata é relativamente rápida, variações no comprimento da linha de transmissão z-w não foram sentidas. Esta linha foi então mantida em 10 cm .

3.2.2. Determinação turbidimétrica de sulfato

Os cristais de BaSO_4 apresentam-se sob forma de uma fina suspensão, e suas características dependem das condições de supersaturação e da presença de surfactantes no meio reacional para formar agregados de precipitado. Assumindo a premissa de que as partículas de sulfato de bário formadas tendem a apresentar, no equilíbrio, a mesma forma e o mesmo tamanho (em presença de surfactantes), a turbidez medida é proporcional ao número de partículas formadas por unidade de volume, refletindo então a concentração do analito (KRUG et al., 1977). De fato, medidas de turbidância na ausência de surfactantes não foram repetitivas (d.p.r. $> 30 \%$). Além disso, a adição de surfactantes no meio reacional leva à melhor limpeza do percurso analítico, evitando que cristais de sulfato de bário fiquem retidos nos pontos de confluência, nas conexões ou mesmo adsorvidos às paredes internas do percurso analítico. Neste contexto, a concentração selecionada foi de $0,3\%$ (v/v) Tween-80 no reagente R_3 , uma vez que esta resultava em sinais analíticos repetitivos (d.p.r. $< 2\%$) e linha base estável ($< 0,05$ turbidância por hora).

Relativamente à concentração de bário, concentrações inferiores a $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ não levaram à obtenção de limites de detecção satisfatórios, provavelmente devido às condições inadequadas de supersaturação. Os sinais analíticos aumentaram com o aumento da concentração de bário (Figura 3.6a), porém maiores concentrações deste reagente comprometiam a repetibilidade do sinal analítico e o valor do branco era muito incrementado, provavelmente devido ao aumento do efeito Schlieren. De fato, para $> 0,20 \text{ mol L}^{-1}$ Ba, observou-se um aumento de *ca.* 8% relativamente à magnitude dos sinais registrados, porém, a repetitividade dos sinais foi comprometida. Desta forma, a concentração de bário foi selecionada como $0,20 \text{ mol L}^{-1}$.

Realizando a estratégia de parada dos fluxos quando o sinal analítico apresentava-se no valor máximo de turbidância, foi possível inferir que a velocidade de formação dos cristais de sulfato de bário é relativamente lenta, corroborando os resultados relatados por Krug (1984).

Analogamente à determinação de cloreto, a adição de íons sulfato no meio reacional resultou em melhoria do limite de detecção. Desta forma, a concentração de sulfato presente no reagente R₄ foi avaliada e fixada em 100 mg L⁻¹ SO₄ (Figura 3.6b). O emprego de concentrações menores levava à obtenção de limites de detecção insatisfatórios devido provavelmente às condições inadequadas de supersaturação do meio reacional. Por outro lado, concentrações superiores a 100 mg L⁻¹ SO₄ resultaram em altos valores de turbidância para o branco analítico.

Na determinação turbidimétrica de sulfato, a acidez exerce um importante papel na cinética de nucleação e crescimento dos cristais, uma vez que estes se formam em meio levemente ácido. Além disso, a acidez é recomendada para prevenir uma possível precipitação de outros sais de bário, tais como carbonato e fosfato. As curvas descrevendo a cinética de nucleação indicam que, após o equilíbrio, há diferenças no número final de partículas formadas para diferentes níveis de acidez (SALUTSKY; GRACE, 1959). Neste sentido, à medida em que a acidez do meio reacional aumentou (> 2,5 mol L⁻¹), observou-se uma diminuição na turbidez, devido provavelmente ao aumento da solubilidade do precipitado, prejudicando então a formação dos cristais (Figura 3.6c). Por outro lado, sob condições de acidez inferiores a 2,0 mol L⁻¹ HNO₃, a repetitividade dos sinais analíticos foi comprometida, embora a magnitude dos sinais analíticos fosse maior. Neste contexto, foi selecionado 2,0 mol L⁻¹ HNO₃.

Relativamente ao dimensionamento do sistema, observou-se que o comprimento do reator B₂ influencia diretamente na sensibilidade do método (Figura 3.6d). À medida em que se aumentava este parâmetro, a dispersão da amostra aumentava, porém era esta compensada pelo aumento da turbidez formada. Desta forma, selecionou-se B₂ como 250 cm.

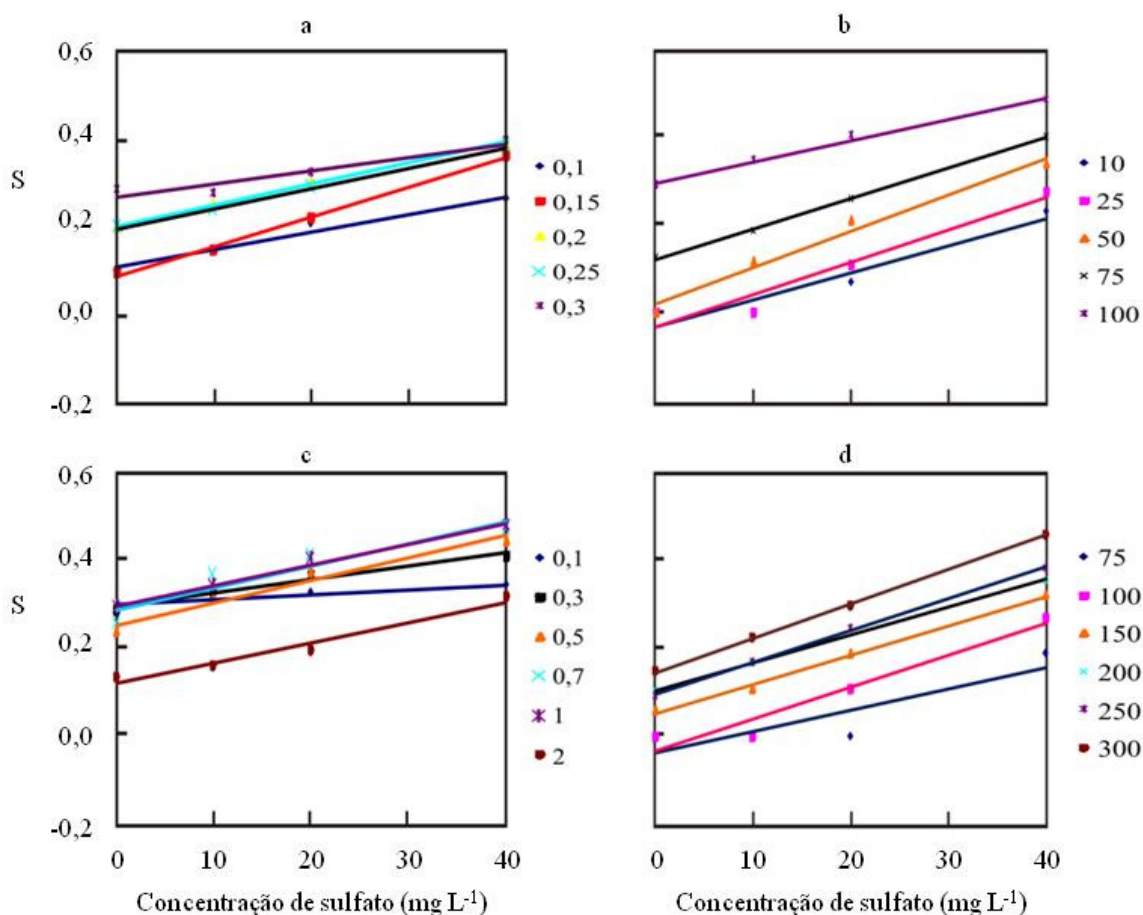


Figura 3.6. Influência da variação dos principais parâmetros referentes à determinação de sulfato. (a) Concentração de bário (0,1 – 0,3 mol L⁻¹); (b) Concentração de sulfato (10,0 – 100,0 mg L⁻¹); (c) Acidez do meio reacional (0,1 – 2,0 mol L⁻¹ HNO₃); (d) Comprimento do reator B₂ (75 - 300 cm).

Este fato evidencia que a reação de formação dos cristais de BaSO₄ é relativamente lenta. Como um compromisso entre sensibilidade, limite de detecção e velocidade de processamento da amostra, a vazão total e o volume inserido de amostra foram selecionados como 3,2 mL min⁻¹ e 460 μL, respectivamente.

3.2.3. Figuras de mérito analítico

O sistema proposto foi aplicado a análises em larga escala de águas naturais. Aproximadamente 10 amostras foram analisadas por hora, resultando em um consumo de 1,9 g de nitrato de bário e 86 mg de nitrato de prata por determinação. A frequência

analítica é melhorada quando o sistema não solicita a repetição das replicatas previamente definidas, podendo reduzir o número total de determinações em aproximadamente 20%. As características do sistema inteligente proposto são mostradas na Tabela 3.2.

Tabela 3.2. Características do sistema de análises proposto para análise de cloreto e sulfato em águas naturais.

Módulo de análises	Figuras de mérito analítico
R ₁ : 0,01 mol L ⁻¹ Ag em 3,0 mol L ⁻¹ HNO ₃ a 1,0 mL min ⁻¹	Velocidade analítica: 10 amostras por hora
R ₂ : 8,0 mg L ⁻¹ Cl a 1,0 mL min ⁻¹	r = 0,979 e 0,993 (n = 5) para Cl e SO ₄
R ₃ : 0,16 mol L ⁻¹ Ba em 0,3% Tween-80 a 0,8 mL min ⁻¹	Limites de detecção (3σ): 0,7 mg L ⁻¹ Cl e 1,3 mg L ⁻¹ SO ₄
R ₄ : 100 mg L ⁻¹ SO ₄ em 2,0 mol L ⁻¹ HNO ₃ a 0,8 mL min ⁻¹	Limites de quantificação (10σ): 2,3 mg L ⁻¹ Cl e 3,7 mg L ⁻¹ SO ₄
R ₅ : 0,3 % m/v EDTA em 0,2 mol L ⁻¹ NaOH a 0,8 mL min ⁻¹	Teste t (95%): 2,19 (Cl) e 0,48 (SO ₄); t crítico: 3,18
R ₆ : 0,1 mol L ⁻¹ NaOH a 1,2 mL min ⁻¹	
R ₇ : 1,5 mol L ⁻¹ HNO ₃ a 7,5 mL min ⁻¹	
C: água	
Volume de amostra: 160 μL (Cl) e 460 μL (SO ₄)	
Comprimentos dos reatores: 75 e 200 cm	
Comprimento de onda selecionado: 410 nm	
Faixa analítica: 2,5 - 10,0 mg L ⁻¹ Cl e 4,0 - 40,0 mg L ⁻¹ SO ₄	

O sistema se mostrou estável e robusto, não apresentando derivas significativas de linha base durante um período de 4 horas. As curvas analíticas eram lineares para ambos os analitos, com coeficientes de regressão linear estimados em 0,997 e 0,993 (n = 5) para cloreto e sulfato, respectivamente. Os limites de detecção (3σ) e de quantificação (10σ) foram estimados como 0,7 mg L⁻¹ Cl e 1,3 mg L⁻¹ SO₄, e 2,3 mg L⁻¹ Cl e 3,7 mg L⁻¹ SO₄ respectivamente. A exatidão analítica pode ser comprovada analisando-se a Tabela 3.3 que inclui os resultados obtidos pelo método proposto e por cromatografia iônica (GROS; GORENC, 1994).

Tabela 3.3. Resultado das análises de águas naturais. Dados expressos em g L⁻¹ e referentes às concentrações dos analitos antes da diluição prévia exigida para análise deste lote de amostras.

Amostra	Cloreto		Sulfato	
	Sistema proposto	Cromatografia iônica	Sistema proposto	Cromatografia iônica
1	8,95 ± 0,16	9,22 ± 0,05	1,33 ± 0,02	1,33 ± 0,01
2	5,50 ± 0,67	5,56 ± 0,06	1,30 ± 0,02	1,33 ± 0,03
3	5,25 ± 0,13	5,84 ± 0,04	0,95 ± 0,01	0,96 ± 0,01
4	5,15 ± 0,03	5,27 ± 0,01	1,12 ± 0,01	1,10 ± 0,01

3.3. Conclusões

Os resultados das análises são repetitivos e efeitos relativos à presença de íons potencialmente interferentes, nas concentrações encontradas geralmente em águas naturais, não foram observados. Como método comparativo, utilizou-se a cromatografia iônica, não sendo encontradas diferenças significativas entre os métodos ao nível de 95%. Deve-se salientar que a implementação dos dois métodos em um único sistema de análises não prejudicou a repetibilidade das medidas, uma vez que suas características analíticas foram mantidas.

A implementação de métodos turbidimétricos em sistemas inteligentes envolvendo multi-impulsão mostrou ser uma excelente estratégia. O sistema proposto é versátil, sendo o número de replicatas fixado ao longo do procedimento, de acordo com a estimativa das incertezas.

Ainda, a decisão em tempo real relativo à determinação de cloreto ou cloreto mais sulfato pode identificar a origem das amostras (estuarinas ou continentais) uma vez que o cloreto é utilizado como indicativo de salinidade. Como altos teores dos analitos eram esperados, as amostras foram diluídas aproximadamente 200 vezes manualmente. Tendo em vista as potencialidades, a estratégia proposta pode ser recomendada para as análises em larga escala. De fato, decisões em tempo real baseadas em análises prévias se constituem em uma ferramenta fundamental para expandir a capacidade do laboratório, mantendo benefícios como custo e qualidade nos resultados analíticos.

4. REGIME DE ESCOAMENTO

O regime laminar de escoamento é uma característica inerente aos sistemas de análises em fluxo (BETTERIDGE; FIELDS, 1978) o que se comprova ao se considerar as vazões e os diâmetros dos reatores tubulares usualmente empregados. Nesta condição, a velocidade linear dos elementos de fluido no centro do tubo é de aproximadamente duas vezes a velocidade média dos elementos de fluido, e as velocidades dos elementos de fluido adjacentes às paredes dos tubos tendem a zero (ZAGATTO; WORSFOLD, 2005). Têm-se assim, cilindros concêntricos deslocando-se a diferentes velocidades lineares (KORENAGA et al., 1988). Este efeito convectivo resulta em uma pronunciada dispersão axial da zona da amostra.

Por outro lado, o fluxo turbulento caracteriza-se pelo movimento aleatório dos elementos de fluido. A velocidade linear média destes não varia de forma significativa em função da posição radial; os efeitos da dispersão axial são menos pronunciados devido principalmente ao transporte radial de massas.

A possibilidade de se explorar as condições de mescla turbulenta (do inglês *turbulent mixing*) com o intuito de se minimizar a dispersão da amostra em um sistema de análises em fluxo pode representar uma alternativa viável (Figura 4.1). Historicamente, o fluxo turbulento foi intuitivamente previsto quando os sistemas de análises em fluxo foram concebidos (RUZICKA; HANSEN, 1975), porém os autores logo perceberam que o fluxo laminar prevalecia (RUZICKA; HANSEN; ZAGATTO, 1977).

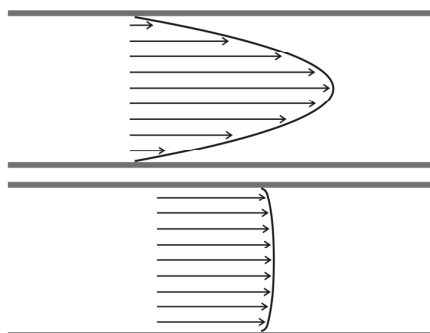


Figura 4.1. Representação esquemática das velocidades lineares em um fluxo laminar (acima) e em um fluxo turbulento (abaixo).

Anos mais tarde, Owens e colaboradores (1980) utilizaram como unidade propulsora dos fluídos uma bomba que fornecia fluxo pulsado (pulsos de soluções) a uma vazão constante. Observaram o deslocamento caótico dos elementos de fluido, resultado da variação de velocidade e direção, obtendo-se assim uma mescla turbulenta. Sucessivos volumes de soluções eram inseridos sob a forma de pulsos no percurso analítico, resultando em um fluxo que fluía com paradas repentinas entre cada pulso (período *stop*). Por outro lado, observava-se uma mescla turbulenta durante os curtos períodos *go* de pulso (FRANCIS et al., 2002). Entretanto, a exploração de fluxos pulsados não representa uma garantia de se obter um regime de fluxo turbulento, pois parâmetros como vazão, viscosidade e a plasticidade das paredes do tubo exercem um significativo papel. As principais vantagens desta estratégia, tais como uma eficiente condição de mistura e uma alta frequência analítica foram relatadas em diversas aplicações que buscavam a determinação de constantes de velocidade de reações químicas.

Sabe-se que a dispersão da zona de amostra é a principal fonte de *carryover*² e quando se deseja reduzir o tempo de análise, o tempo de limpeza ou aumentar a frequência analítica, é necessário que este seja minimizado. Desta forma, as estratégias eventualmente propostas com o intuito de se reduzir a dispersão da zona de amostra e/ou melhorar as condições de mistura normalmente empregam ligeiras alterações no regime de fluxo laminar. As estratégias mais empregadas envolvem o uso de reatores tubulares espiralados (KORENAGA et al., 1988) e/ou segmentação (SKEGGS, 1957), onde fluxos secundários são estabelecidos (TIJSEN, 1980), os quais exercem um efeito benéfico no desempenho do sistema (VALCARCEL; LUQUE DE CASTRO, 1987). Efeitos similares podem ser obtidos quando se empregam materiais empacotados (den BOEF et al., 1986) ou reagentes imobilizados (REIJN; POPPE; van der LINDEN, 1983). Estratégias como a exploração de fluídos super críticos (BYSOUTH; TYSON, 1992) ou o uso de um fluxo transportador gasoso também foram propostas (RAMASAMY; JABBAR; MOTOLLA, 1980), porém apresentam um número de aplicações bastante restrito.

Aspectos benéficos relacionados à exploração de fluxos pulsados (FRANCIS et al., 2002) produzidos por bombas solenóide têm sido relatados (LAPA et al., 2002).

² Alteração no sinal analítico devido ao processamento da amostra anterior.

Dentre eles, podem ser destacados melhorias em sensibilidade conseguidas em reações lentas e em reações que utilizam aquecimento (DIAS et al., 2007; ALVES et al., 2009).

É importante salientar que durante o desenvolvimento dos sistemas de análises empregando fluxos pulsados, a expressão fluxo turbulento tem sido empregada, porém não é perfeitamente exata, pois o tempo correspondente ao período *go* de uma bomba solenóide (Figura 4.2) é muito curto para se caracterizar um regime de escoamento.

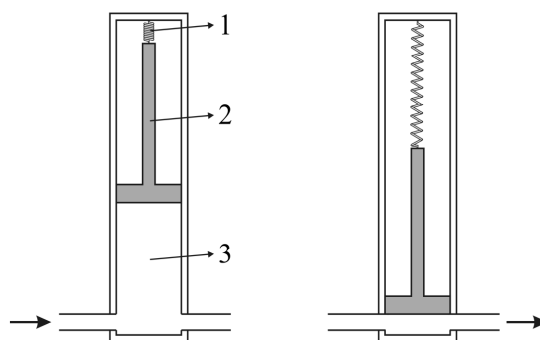


Figura 4.2. Funcionamento da bomba solenóide. Representação à esquerda: período *go* e à direita período *stop*. Os números 1, 2 e 3 se referem a mola, pistão em torno do qual o solenóide é preso e câmara que define o volume a ser bombeado, respectivamente. Válvulas unidirecionais não especificadas.

Considerando que, sob condições de regime laminar de escoamento, a dispersão da zona de amostra pode ser resultado do estabelecimento de cilindros concêntricos, enquanto que, sob condições de regime turbulento estes cilindros não são formados, espera-se que a influência da reversão de fluxos na dispersão da zona de amostra possa indicar a natureza ou a tendência do regime de fluxo estabelecido.

Sob regime laminar de escoamento, o efeito da dispersão aumenta durante o transporte da zona de amostra uma vez que os cilindros são continuamente “esticados”. Após a reversão de fluxos, os cilindros tendem a “encolher” restaurando a distribuição original da zona de amostra. Quando se utiliza o fluxo pulsado, entretanto, a deconvolução da zona de amostra pode não ser tão significativa após a reversão dos fluxos, uma vez que o transporte radial de massa é comparativamente mais eficiente e as condições de mistura são melhores, o que torna a zona de amostra mais homogênea.

Para demonstrar estes efeitos antagônicos e avaliar as evidências relativas à existência de mescla turbulência quando se utiliza os fluxos pulsados, um sistema MCFS e outro MPFS foram projetados da forma mais similar possível, com a opção de reverter os fluxos ou não. A única diferença entre eles consistiu na forma como os

fluídos eram inseridos no módulo de análises (continuamente ou como pulsos). Para isto, informações referentes ao formato do sinal analítico registrado, reversão de vazão e obtenção de imagens de zonas de amostra foram avaliadas. Adicionalmente, pretendeu-se obter uma estimativa experimental do número de Reynolds.

4.1. Material e métodos

4.1.1. Materiais

Os equipamentos empregados consistiram em um analisador FIALab – 3000, incluindo um espectrofotômetro modelo USB 2000 UV-vis Ocean Optics integrado a uma cubeta de fluxo em Z de acrílico (RUZICKA, 2000) com volume interno = 10 μ l e passo óptico = 10 mm. O comprimento de onda foi fixado em 512 nm e o tempo de integração foi de 50 ms.

Uma bomba peristáltica (modelo IPC-08, Ismatec, Suíça) provida de tubos de bombeamento de Tygon com diferentes diâmetros internos, e bombas solenóide (Bio-Chem Valve Inc., Boonton NJ) com volumes de pulsos de 8 e 25 μ l foram empregadas como unidades propulsoras de fluidos. Válvulas solenóide de três vias (modelo MTV-3-N1/4UKG, Takasago Electric Inc., Nagoya, Japan) foram utilizadas. As válvulas e as bombas eram controladas por meio de computador, através da interface PCL-711 (Advantech, Cincinnati OH, USA).

A unidade de detecção consistiu em um analisador FIALab – 3000, incluindo um espectrofotômetro modelo USB 2000 UV-vis da Ocean Optics integrado a uma cubeta de fluxo em Z de acrílico (RUZICKA, 2000) com 10 μ l de volume interno e passo óptico de 10 mm. Para a estimativa experimental do número de Reynolds, registraram-se os sinais analíticos com um tempo de integração de 50 ms, e para aquisição das imagens da zona de amostra fluindo sob diferentes regimes de escoamento, utilizou-se uma câmera Webcam SPC 1300NC *glass precision optics* f:24 (Philips).

Para a confecção das linhas de transmissão bem como as bobinas reacionais foram utilizados tubos de polietileno de diâmetro interno igual a 0,8 mm. Foram

empregadas soluções diluídas de verde de bromocresol (BCG) para simular a zona de amostra, e como fluxo transportador quimicamente inerte, utilizou-se água.

4.1.2. Operação do sistema

O modo de funcionamento da reversão do sentido de deslocamento da zona de amostra é mostrado esquematicamente na Figura 4.3.

No sistema MCFS mostrado na Figura 4.4 (esquerda), caracterizado por regime de escoamento laminar, empregou-se uma bomba peristáltica como unidade propulsora dos fluídos, enquanto que para o sistema MPFS (Figura 4.4 direita), utilizaram-se bombas solenóide.

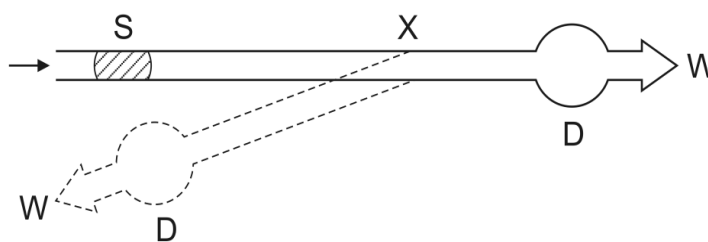


Figura 4.3. Esquema da reversão do sentido de deslocamento da zona de amostra.

A amostra era inserida no percurso analítico e percorria ora 200 cm no mesmo sentido, ora 100 cm e, após reversão do sentido, outros 100 cm. Os sinais analíticos foram comparados em termos de intensidade, altura e tempo de limpeza.

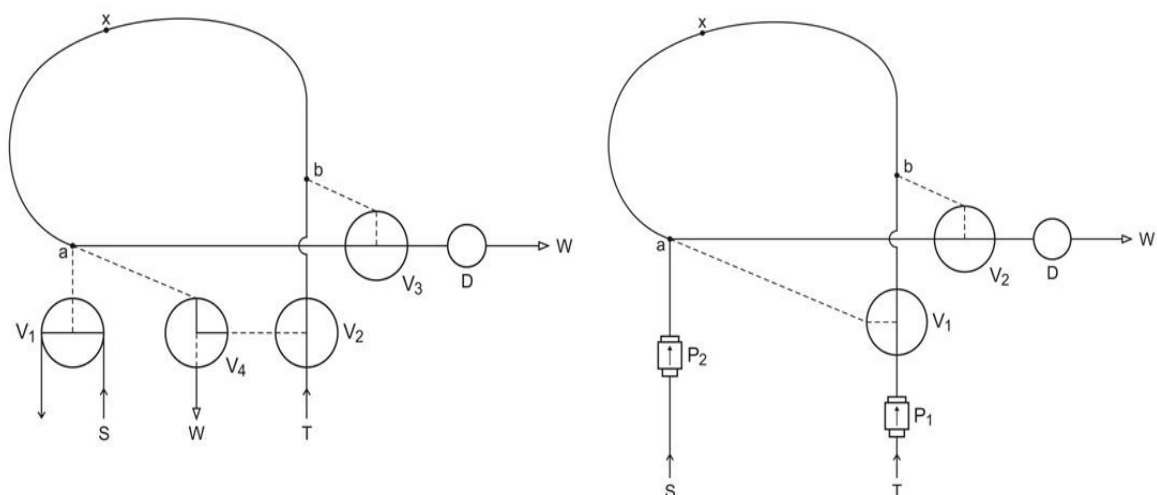


Figura 4.4. Diagramas de fluxos dos sistemas MCFS (esquerda) e MPFS (direita) com reversão do sentido de deslocamento da zona de amostra; V_i : válvulas três vias; P_i : bombas solenóides; S: amostra; T: fluxo transportador; D: detector; x: ponto de reversão opcional; W: descarte; a e b pontos de confluências.

4.1.3. Procedimento experimental

Estimativa do número de Reynolds

O sistema MPFS mostrado na Figura 4.4 (direita) foi utilizado para a determinação experimental do número de Re , modificando-se apenas o comprimento do percurso analítico para 30 cm a fim de minimizar o efeito de amortecimento devido à plasticidade da tubulação. Na situação especificada na Figura 4.4 (direita), a bomba P_1 era ligada para a inserção do fluxo transportador no sistema de análises; para a inserção da amostra, a bomba P_1 era desligada e simultaneamente a bomba P_2 era ligada, inserindo a alíquota de amostra no percurso analítico, definida em termos de números de pulsos. Após a inserção, a bomba P_1 era ligada e a P_2 desligada, estabelecendo uma zona de amostra que era direcionada ao detector. Neste experimento, a válvula V_1 sempre foi mantida ligada e a válvula V_2 , desligada. A passagem da zona de amostra pelo detector resultava em um sinal analítico na forma de um pico. Este apresenta perfil em forma de escada (*stair-like*), onde as linhas horizontais correspondem aos períodos de *stop* da bomba e as linhas verticais correspondem ao período *go* das mesmas. A inclinação das

linhas quase verticais permitia uma avaliação da vazão durante o período g_o . Esta (Q_{g_o}) era estimada como:

$$Q_{g_o} = VP \times (\Delta t_{g_o})^{-1} \quad (\text{Eq. 4.1})$$

onde, V_P : volume de pulso da bomba solenóide (Istroke); Δt_{g_o} : intervalo de tempo referente ao período g_o .

O valor Q_{g_o} se associa ao número de Reynolds (Re) segundo a expressão:

$$Re = \frac{Qud}{\mu} \quad (\text{Eq. 4.2})$$

onde, Q : densidade do fluido (kg m^{-3}); μ : viscosidade dinâmica ($\text{kg m}^{-1}\text{s}^{-1}$); d : diâmetro (m) e u : velocidade do fluido (m s^{-1}) (*i.e.* vazão ($\text{m}^3 \text{s}^{-1}$) / área da secção transversal (m^2)).

Para $Re < 2000$, o fluxo é laminar; a transição gradual entre laminar e turbulento ocorre para Re entre 2000 – 4000; e a turbulência é estabelecida para $Re > 4000$ (MASSEY; WARD-SMITH, 2006).

Fluxo reverso

Os sistemas de análises em fluxo apresentados na Figura 4.4 permitem que a reversão no sentido de deslocamento da zona de amostra seja facilmente conseguida. Quando esta reversão não era requerida, a zona de amostra fluía através do reator diretamente para a detecção. Alternativamente, a zona de amostra fluía até atingir a metade do reator (ponto x, Figura 4.4); o sentido de deslocamento da amostra era então revertido, e a amostra fluía novamente através da metade já percorrida em direção ao detector. Desta forma, tanto a distância total percorrida como o tempo de residência eram mantidos independentemente da utilização ou não da reversão, ajustando-se para isto o volume de fluxo transportador após cada variação do volume de amostra.

Na situação especificada na Figura 4.4 (direita), a bomba P_1 e as válvulas V_1 e V_2 eram ligadas, fazendo com que o fluxo transportador percorresse todo o reator, e

definissem a linha base. Para a inserção da zona de amostra, P_2 e V_2 eram ligadas enquanto que P_1 e V_1 desligadas. Após a inserção do volume de amostra, a condição inicial (P_1 , V_1 , V_2 ligadas) era restabelecida. A zona de amostra era então conduzida ao detector. Para a implementação do fluxo reverso, o mesmo procedimento para a inserção de amostra era realizado. Porém, quando a zona de amostra atingia a metade do reator (ponto x – Figura 4.4 direita), as válvulas V_1 e V_2 eram desligadas, invertendo o sentido de deslocamento da amostra e posicionando o detector de forma a monitorar a amostra dispersa.

Com relação ao sistema da Figura 4.4 (esquerda), a amostra era inserida ligando-se as válvulas V_1 , V_2 , V_3 e V_4 durante um intervalo de tempo definido, o qual definia o volume de amostra. A zona de amostra era conduzida diretamente ao detector desligando-se as válvulas V_1 e V_4 e mantendo ligadas as válvulas V_2 e V_3 . Alternativamente, todas as válvulas eram desligadas quando a zona de amostra atingia o ponto x, resultando na reversão do sentido de escoamento dos fluxos e posterior detecção (Tabela 4.1).

A influência do volume de amostra foi investigada entre 100 e 400 μL , variando-se ora o número de pulsos inseridos no percurso analítico, ora o intervalo de acionamento da válvula V_1 . Analogamente, a influência da vazão foi investigada entre 2,0 e 5,0 mL min^{-1} . Para isto, ora a rotação da bomba peristáltica ora a frequência de pulsos das bombas solenóide era variadas. O comprimento do percurso analítico foi investigado entre 200 e 500 cm.

Tabela 4.1. Operação do sistema utilizado para a exploração de fluxo reverso. V_i : válvulas solenóide; P_i : bombas solenóide.

	Laminar	Pulsado
Amostragem	$V_1+V_2+V_3+V_4$	P_2+V_2
Reação (fluxo direto)	V_2+V_3	$P_1 + V_1 + V_2$
Amostragem	$V_1+V_2+V_3+V_4$	$P_2 + V_2$
Reação (fluxo reverso)	---	P_1

4.2. Resultados e discussão

Número de Reynolds

O volume de pulso (V_p) foi volumetricamente determinado e o valor Δt_{go} (intervalo de tempo entre as duas sucessivas linhas horizontais - Figura 4.5) foi graficamente avaliado. Uma única etapa não era suficiente para uma boa estimativa da Δt_{go} , uma vez que as incertezas na medida do intervalo manifestaram-se como fatores limitantes. Considerando o mesmo intervalo de tempo relacionado com cinco sucessivos “degraus” registrados, Δt_{go} foi estimado como $0,221 \pm 0,028$ s. Este domínio do tempo engloba 14 medições de absorbância. Para um volume de pulso $25 \mu\text{L}$, a vazão associada ao período *go* foi determinada (Eq. 4.1) como:

$$Q_{go} = (125 \mu\text{L}) \times (0,221 \pm 0,028)^{-1} = 33,9 \pm 4,3 \text{ mL min}^{-1}$$

Para tubos com 1,0 mm de diâmetro interno, uma vazão de 93 mL min^{-1} é necessária para se instituir um regime de fluxo turbulento (BETTERIDGE; FIELDS, 1978). Este número corresponde a $74,4 \text{ mL min}^{-1}$ se um 0,8 mm for empregado. Sob esta situação, Re pode ser estimado (Eq. 4.2) como:

$$Re = [(33,9 \pm 4,3) / 74,4] \times 2000 = 911 \pm 115.$$

O valor real da Re é provavelmente maior do que 911 ± 115 , uma vez que os efeitos do volume interno da cubeta de fluxo, tempo de resposta do detector não foram levados em consideração para a avaliação Δt_{go} . Deve-se enfatizar ainda que o valor Δt_{go} é uma média, e nos primeiros instantes deve assumir um valor bastante superior a 911 ± 115 .

Outro aspecto a ser considerado é que, durante o período *go*, a alta pressão interna leva provavelmente a uma alteração temporária na geometria da tubulação, e este efeito pode ser compensado (relaxamento) durante a primeira parte do período *stop*. O fenômeno é evidente na Figura 4.5. A tendência para a acomodação se manifesta

imediatamente após o período go com o ligeiro decréscimo na absorvância monitorada, e este efeito é, portanto, um fator limitante na precisão da determinação Δt_{go} .

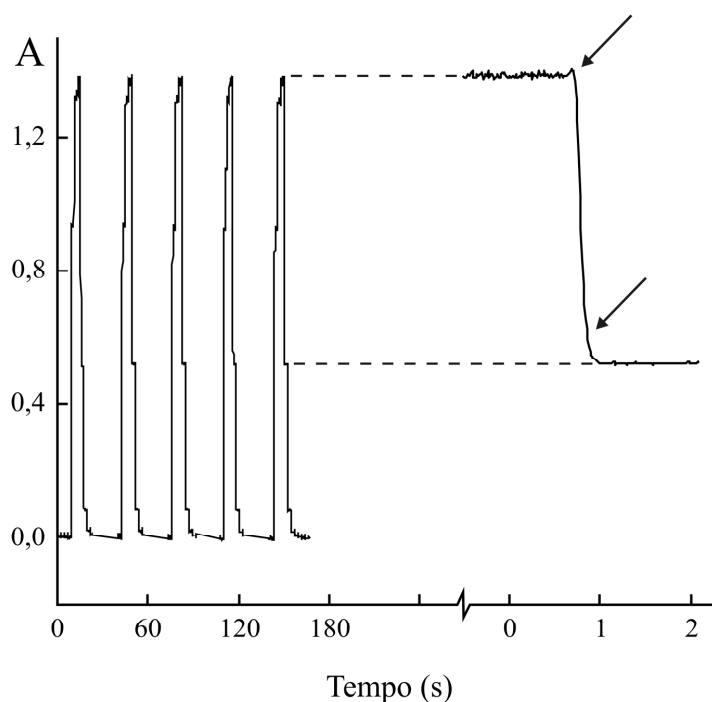


Figura 4.5. Registro do sinal analítico referente ao sistema MPFS da Figura 4.4 direita. Volume do pulso: 25 μL ; volume de amostra: 25 μL (25 mg L^{-1} verde de bromocresol); comprimento do reator: 30 cm; comprimento de onda: 617 nm; tempo de integração: 50 ms. Intervalo de tempo entre as duas setas inclinadas = Δt_{go} .

Deve-se enfatizar ainda que um regime de escoamento turbulento não deve ser considerado nestas condições experimentais uma vez que o intervalo de tempo correspondente ao período go (0,221s) não é suficiente para estabelecer um regime de escoamento. Considerando a vazão e as dimensões dos tubos empregados geralmente em sistemas de fluxos não segmentados, prevalece o regime laminar. Esta é a principal razão da expressão:

“it is unlikely that FIA has ever been carried out with turbulent flow”

ser encontrada na literatura (BETTERIDGE; FIELDS, 1978). De fato, para tubos com diâmetro interno de 1-mm, seria necessária uma vazão de 93 mL min^{-1} para se obter um regime de escoamento turbulento, fato não praticável nos típicos sistemas de análises em fluxo

Fluxo reverso

Os sistemas de análises em fluxo da Figura 4.4 apresentam resultados reprodutíveis, com desvios padrão relativos entre $< 1\%$ e $< 3\%$, estimados para altura e largura do sinal analítico, respectivamente. As incertezas não foram afetadas pela reversão do fluxo. Os sinais analíticos obtidos revelaram diferenças em dispersão na zona de amostra sob condições de fluxo constante ou pulsado. No sistema empregando bomba peristáltica, é notável o efeito da reversão de vazão na sensibilidade analítica, ao passo que no sistema MPFS a diferença em magnitude dos sinais é mínima (Figura 4.6) utilizando-se fluxo reverso ou não.

A reversão dos fluxos mostrou-se uma estratégia adequada para visualizar a tendência do estabelecimento da mescla turbulenta nos sistemas MPFS, uma vez que os efeitos da reversão dos fluxos eram mais pronunciados nos sistemas operando sob condições de escoamento laminar, devido à deconvolução do pico causado pelo “encolhimento” dos cilindros isoconcêntricos típicos de um regime de fluxo laminar. Por outro lado, a influência da reversão de fluxo nos sistemas MPFS é menos pronunciada, confirmando existência de uma mescla turbulenta. Diferenças significativas relacionadas com a altura do sinal analítico e tempo de limpeza (ou velocidade analítica) foram observados. Ainda, observou-se que nas situações onde havia a reversão de sentido de escoamento, o formato do pico se aproximava de uma Gaussiana. Este fenômeno foi mais pronunciado em relação aos sistemas MCFS, enquanto sinais analíticos mais simétricos foram observados nos sistemas MPFS, evidenciando novamente a possibilidade de ocorrer uma mescla turbulenta. Estes fatos evidenciam a mais eficiente mistura radial dos sistemas com fluxo pulsado, relativamente ao fluxo laminar.

Relativamente à influência do volume de amostra foram observadas diferenças significativas relativamente às magnitudes dos sinais analíticos, proporcionais ao volume de amostra inserido (Figura 4.7), confirmando que a extensão de deconvolução do pico é pouco influenciada pelo volume de amostra. Pode-se inferir então, que independentemente da reversão dos fluxos, a dispersão segue a relação já conhecida entre volume de amostra vs altura do pico registrado (RUZICKA; HANSEN, 1978).

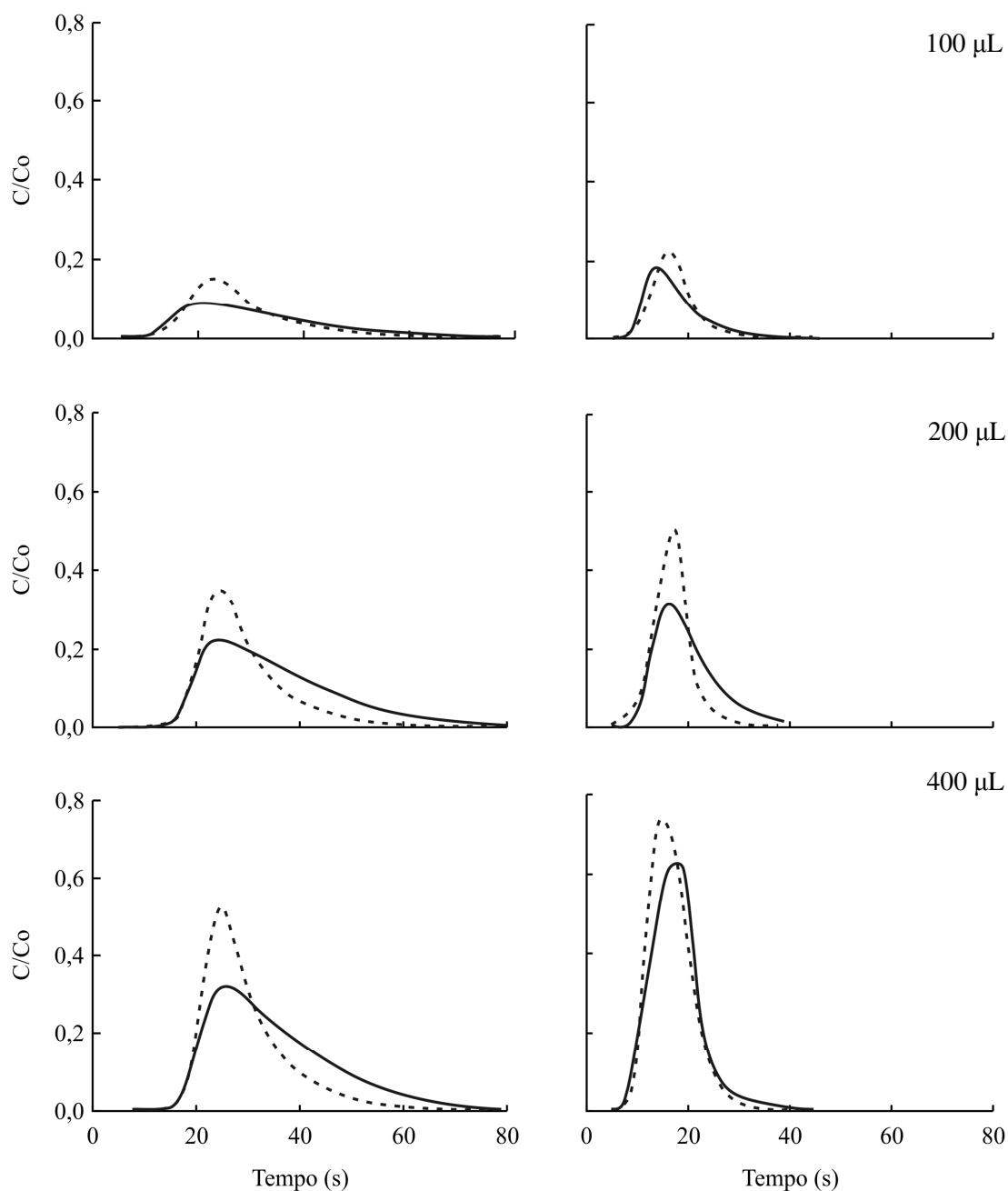


Figura 4.6. Influência da reversão do fluxo no formato do sinal analítico para MCFS (esquerda) e MPFS (direita). C/C_0 = fração volumétrica; Linha contínua: fluxo direto; linha tracejada: à reversão de sentido de escoamento; vazão: $2,0 \text{ mL min}^{-1}$; comprimento do reator: 200 cm; solução empregada para mimetização da amostra: 25 mg L^{-1} de verde de bromocresol. Os volumes de amostra estão indicados na própria figura.

Relativamente à influência da vazão do sistema, para o sistema MCFS, pequenas variações em magnitude do sinal analítico ($< 20\%$) foram observadas quando esta foi variada, independentemente da reversão ou não do escoamento. Estas variações foram menos pronunciadas para MPFS, enfatizando a menor influência da vazão na dispersão da amostra (TROJANOWICZ, 2000).

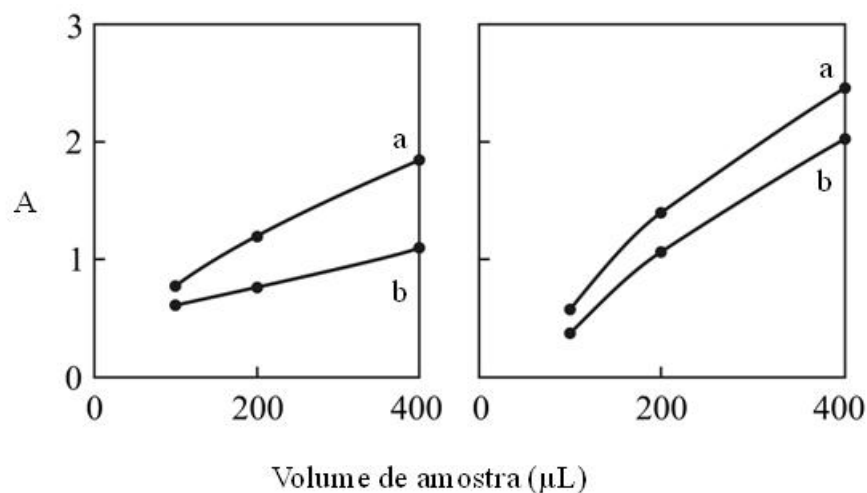
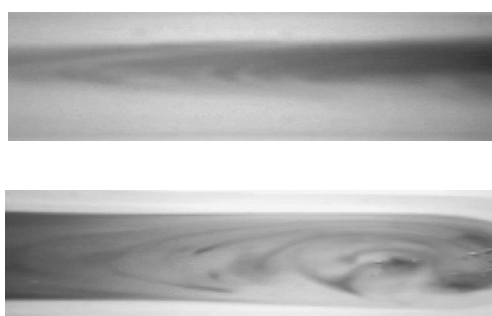


Figura 4.7. Influência do volume de amostra nos sistemas MCFS (esquerda) e MPFS (direita). Letras a e b: fluxo direto e reverso. Condições experimentais especificadas na Figura 4.6.

Levando-se em conta que a dispersão resultante em um fluxo laminar e em um fluxo pulsado são distintas, optou-se por analisar as imagens da zona de amostra sob as duas condições. Para isto, utilizaram-se os sistemas de análises mostrados na Figura 4.4, substituindo-se o percurso analítico por um cilindro de vidro (d.i: 2,0 mm, comprimento: 3,0 cm). As imagens obtidas (Figura 4.8) revelam o fluxo laminar estabelecido nos sistemas MCFS enquanto que nos sistemas MPFS observam-se vórtices, caracterizando uma mescla turbulenta. Estes vórtices são talvez os principais contribuintes para a melhoria no transporte radial de massas.



2.0 mm

Figura 4.8. Imagens da zona de amostra sob fluxo laminar (acima) e fluxo pulsado (abaixo). As paredes do tubo não são mostradas. O fluxo se desloca da direita para a esquerda.

4.3. Conclusões

Pode-se observar que o emprego do fluxo reverso garante um tempo de residência e dispersão igual para as extremidades da zona da amostra proporcionando um aumento na sensibilidade do método, além de restaurar a distribuição original da zona da amostra. Os resultados referentes ao sistema MCFS mostraram que a sensibilidade analítica pode assumir valores mais expressivos em sistemas onde baixos valores de concentração são evidentes, quando da reversão de fluxo. Para o sistema MPFS o efeito da reversão se mostrou menos pronunciado, indicando maior dispersão no sentido radial. Este fato foi evidenciado devido à similaridade dos sinais transientes, anterior e posterior a reversão de fluxos.

Desta forma, foi possível inferir que o fluxo pulsado apresenta características capazes de melhorar as condições de mistura e reduzir o tempo de limpeza. Pode-se concluir então que os aspectos benéficos relativos à inversão de fluxos podem ser melhores explorados quando aplicados aos sistemas de análises que empregam fluxo laminar, uma vez que este resulta em uma menor dispersão do zona de amostra, com conseqüente incremento na magnitude dos sinais. Esta estratégia também pode ser explorada quando se emprega fluxos pulsados, porém, os benefícios são evidentemente menores.

Nos estudos revisionais verificou-se que algumas expressões como fluxo turbulento e mescla turbulenta têm sido freqüentemente utilizadas quando se empregam fluxos pulsados (FRANCIS et al., 2002), almejando com isto, a minimização de alguns efeitos como *e.g.* alargamento da zona de amostra, *carryover* e tempo necessário para a limpeza do percurso analítico. Entretanto, ao contrário do que se imaginava, o regime de escoamento turbulento não é inerente ao sistema MPFS. Embora se verifique a presença de vórtices, estes não podem ser considerados como um indicativo de regime turbulento, uma vez que podem ser formados em situações onde o número de Reynolds é baixo, e o intervalo de tempo considerado no período *go* (0,221s) é curto para se caracterizar um regime de escoamento. Pode-se concluir então, que a aumento do transporte de massa radial inerente ao fluxo pulsado é devida, provavelmente, a ocorrência de mescla turbulenta.

Em função do melhor transporte radial de massas, é possível afirmar que o emprego de fluxos pulsados é mais recomendado em situações onde a interação entre

elementos de fluido é relevante como, por exemplo, em sistemas explorando reações químicas relativamente lentas e/ou aquecimento do meio reacional. Pesquisas paralelas têm demonstrado que o processo de difusão gasosa é mais eficientemente implementado sob condições de fluxo pulsado.

5. DIÁLISE EM SISTEMAS DE ANÁLISES EM FLUXO

O processo de diálise consiste no transporte seletivo de íons ou moléculas de uma fase líquida (solução doadora) para outra (solução aceptora) através de uma membrana semipermeável. Este transporte seletivo é o resultado de uma propriedade da membrana, a qual permite a passagem de certos compostos e inibe ou retarda a passagem de outros. O processo de separação por diálise normalmente é utilizado para a remoção dos interferentes de uma amostra ou para a retirada dos analitos de uma matriz complexa (KELLNER et al., 2004).

A eficiência do processo de diálise está diretamente relacionada com o número de moléculas que atravessam a membrana por unidade de tempo, e é dependente de alguns fatores tais como a configuração e dimensões da câmara de diálise, propriedades da membrana, condições químicas que envolvem as soluções doadoras e aceptoras, temperatura e vazão (para processos de diálise contínua), dentre outros.

O transporte de íons ou moléculas da solução doadora para a aceptora ocorre quando uma força motriz é aplicada, e cessa quando ela é retirada. Diferentes tipos de força motriz podem ser utilizados, tais como *e.g.* gradiente de concentração e diferença de potencial elétrico (DEAN, 1969; BRUSCHKE, 1995). Desta forma, a diálise pode ser classificada em: diálise passiva, eletrodiálise e *Donnan* diálise (Tabela 5.1).

A diálise passiva é o mais antigo processo de separação por membrana. O primeiro registro de sua utilização data de 1861 quando foi utilizado por Graham (1861). Os íons ou moléculas são separados devido à existência de um gradiente de concentração através de uma membrana neutra, e a seletividade obtida se deve ao tamanho dos poros da membrana. Este processo é normalmente empregado para separar compostos de baixo peso molecular de macromoléculas tais como substâncias húmicas, partículas suspensas, material coloidal, dentre outros (HADDAD, 1989; LEONARD, 1966).

Na eletrodiálise, os íons são transportados seletivamente através de uma membrana sob a influência de um gradiente de potencial, o qual permite o transporte de íons com cargas positivas (ou negativas) e repelem os íons com cargas opostas. Este procedimento tem sido normalmente empregado em sistemas cromatográficos quando se deseja a geração em linha de eluente, ou a neutralização de amostras alcalinas, porém

a sua utilização não é muito comum devido provavelmente ao longo tempo de diálise requerido (HADDAD; LAKSANA, 1994).

Tabela 5.1. Tipos de diálise. (MIRO; FRENZEL, 2004)

Processo de separação	Definição	Aplicação
Diálise passiva	Processo no qual o transporte de espécies químicas através de uma membrana ocorre devido a diferenças de concentração	Separação de compostos de alto e baixo peso molecular
Eletrodiálise	Processo no qual os íons são conduzidos através de uma membrana íon-seletiva sob a influência de um campo elétrico	Separação de eletrólitos de não-eletrólitos
<i>Donnan</i> diálise	Processo no qual a separação ocorre devido à diferenças de força iônica	Preconcentração de analitos, recuperação e padronização

Ao contrário dos dois processos de diálise anteriores, a *Donnan* diálise utiliza uma membrana de troca-iônica, que tem como força motriz do processo a diferença de cargas. Os cátions e ânions são transportados de acordo com a carga da membrana, e o equilíbrio é atingido quando as cargas entre as soluções doadoras e aceptoras são iguais. Um problema relacionado com a membrana de troca-iônica é a sua permeabilidade seletiva (do inglês *permselectivity*), que se refere à permeabilidade para uma determinada espécie quando comparada com outra espécie. Isto permite que todos os íons carregados sejam transportados através da membrana, inclusive os íons da solução acceptora, concentrando assim compostos iônicos.

Ainda, relativamente à maneira como a solução acceptora é manipulada, o processo de diálise pode ser classificado em três tipos: diálise equilíbrio, diálise dinâmica e diálise exaustiva.

Na diálise equilíbrio o transporte de massas ocorre até que a solução doadora e a solução acceptora atinjam a mesma concentração. Esta técnica pode ser empregada em análises do tipo *batch*, onde a solução doadora (amostra) e a solução acceptora são mantidas no módulo de diálises até que o equilíbrio seja atingido necessitando assim de um longo tempo. Uma alternativa proposta para contornar esta limitação consiste na diálise em linha (BRUSCHKE, 1995). Neste procedimento, a solução acceptora é mantida na câmara de diálise enquanto o fluxo doador é bombeado continuamente até que ele apresente a mesma concentração da solução doadora. Estes sistemas são

facilmente automatizados, necessitando então de um sistema de propulsão de fluxos, tubos e conexões.

Por outro lado, na diálise dinâmica, ambas as soluções são bombeadas continuamente no módulo de diálise. O transporte de massas é dependente das condições experimentais (*e.g.* dimensões do canal, vazão, razão entre as soluções doadora e aceptora, propriedades da membrana), e a concentração final do analito na solução aceptora é menor quando comparada com a concentração presente na amostra original. Este processo é o mais compatível com os sistemas de análises químicas em fluxo.

A transferência quantitativa do analito para a solução aceptora pode ser obtida quando se utiliza a diálise exaustiva. Neste processo, a solução doadora é mantida no módulo de análises enquanto a solução aceptora flui continuamente. Isto é mantido até que os analitos a serem dialisados sejam completamente removidos da solução doadora. O alto fator de diluição não pode ser evitado, fazendo-se então necessário o uso de uma etapa de concentração após o processo de diálise. Neste procedimento, o tempo necessário para dialisar e concentrar os analitos é geralmente entre 10 e 30 minutos. O mesmo tem sido frequentemente explorado para etapas de *clean up*.

Diferentes tipos de membrana podem ser utilizados nos processos acima mencionados. A composição química e a morfologia da membrana utilizada em um processo de separação é um fator decisivo que governa a seletividade do transporte. De acordo com a IUPAC (1996), membranas são definidas como:

“structure having lateral dimensions much greater than its thickness, through which mass transfer may occur under a variety of driving forces”

e podem ainda, serem classificadas entre membranas porosas e não-porosas. Esta classificação considera os diferentes mecanismos de separação que as envolvem, tais como exclusão por tamanho e interação química / partição respectivamente (KELLNER et al., 2004).

A técnica de separação por exclusão por tamanho utiliza membranas porosas que possuem uma estrutura definida. As fases vizinhas (solução doadora e aceptora) ficam em contato físico direto através dos poros da membrana, que podem variar entre 10 e 100 μm . É interessante notar que o material que compõe a membrana de exclusão por

tamanho pode interagir com as fases doadora e aceptora através da adsorção ou interação eletrostática ocorrendo, assim, um segundo mecanismo de separação que pode contribuir para a seletividade. Entretanto, algumas vezes este mecanismo é indesejável e difícil de ser evitado (PABBY; RIZVI; SASTRE, 2008). Na diálise, por exemplo, normalmente se utilizam membranas de celulose que possuem grupos carboxílicos, podendo então, atrair cátions e repulsar os ânions (Figura 5.1).

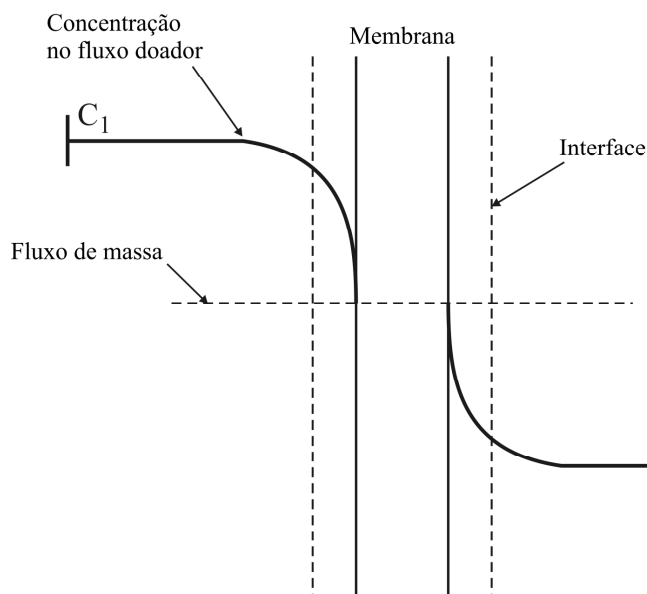


Figura 5.1. Representação esquemática do processo de diálise. Figura adaptada de BEERBAUM (2009).

Alguns materiais poliméricos podem ser preparados de forma que uma estrutura uniforme porosa seja obtida. O tamanho dos poros ou a porosidade podem ser variados para que requisitos particulares em um processo de separação sejam atendidos. Estas membranas são denominadas microporosas, e são normalmente empregadas nos processos de diálise e ultrafiltração. Elas são classificadas de acordo com a sua capacidade de separação que consiste em um valor obtido experimentalmente (MWCO, do inglês *molecular weight cut-off*), definido como o peso molecular no qual 90% dos analitos (ou solutos) são retidos na membrana (HADDAD, 1989). Normalmente MWCO varia entre 100 e 100.000 Dalton (Quadro 5.1).

As membranas não-porosas não apresentam poros detectáveis e são também denominadas homogêneas, uma vez que apresentam essencialmente as mesmas propriedades estruturais em toda a sua espessura. Podem ainda ser representadas por líquidos, membranas gasosas ou filmes poliméricos, e se constituem como uma fase

própria (terceira fase) separando as duas fases em contato nos lados opostos da membrana. As moléculas permeiam na membrana devido a interações específicas tais como força de dispersão, dipolo ou interação eletrostática e/ou pontes de hidrogênio. Deve-se salientar que a membrana, em um sentido amplo, não é necessariamente um material sólido e rígido. Os líquidos e os gases também podem representar uma membrana. Entre os sólidos, uma há grande variedade de materiais (orgânicos e inorgânicos) que podem ser utilizadas como barreiras semipermeáveis (PABBY; RIZVI; SASTRE, 2008).

Origem	Biológica, sintética	
Estrutura	Porosa, não-porosa	
Propriedade química	Polar, não-polar, hidrofóbica, hidrofílica	
Processo de separação	Exclusão por tamanho, partição, atração ou repulsão eletrostática	
Configuração geométrica	Plana, tubular, sacos	
MWCO	100-100.000 Dalton	(1 Da = 1,660 540 x 10 ⁻²⁷ kg)

Quadro 5.1. Características das membranas.

Membranas sólidas, líquidas ou gasosas têm sido utilizadas para o preparo de amostras aquosas apresentando diversos atrativos, dentre eles melhorias em seletividade, amostragem seletiva, automação do processo de diálise em sistemas de análises em fluxo, etc.

O trabalho pioneiro envolvendo diálise em linha e sistemas de análises em fluxo segmentado por ar (CFA) foi realizado por Skeggs (1957). Alguns anos mais tarde, os sistemas FIA se tornaram mais populares (HANSEN; RUZICKA, 1976), porém observa-se que pouca atenção tem sido dada à implementação do processo de separação em linha por diálise (Quadro 5.2). Este fato pode ser atribuído ao tempo relativamente longo requerido. Enquanto os sistemas FIA se caracterizam por apresentarem uma alta frequência analítica (20 a 200 análises h⁻¹), o processo de diálise é normalmente moroso, necessitando em média um intervalo entre 2 e 20 min. Entretanto, os resultados analíticos obtidos através desta junção são extremamente reprodutíveis, capazes de eliminar diversas etapas relativas ao preparo de amostras.

1861	Graham	Primeira tentativa de diálise utilizando membrana animal	(GRAHAM, 1861)
1914	Rowntree, Turner	Primeiro relato de hemodiálise	(ROWNTREE; TURNER, 1914)
1944	Kolff, Berk	Diálise em um rim artificial	(KOLFF; BERK, 1944)
1950	Lonsdale	Primeira membrana de diálise disponível comercialmente	(LONSDALE, 1982)
1957	Skeggs	Diálise em sistemas de análises em fluxo segmentado	(SKEGGS 1957)
1965	Kadish, Hall	Diálise contínua sem segmentação por bôlhas de ar	(KADISH; HAL, 1965)
1976	Hansen, Ruzicka	Diálise em sistemas de análises em fluxo não-segmentado	(HANSEN; RUZICKA, 1976)
1995	Martelli, Gomes Neto, Zagatto	Remoção seqüencial dos analitos por diálise em sistemas FIA	(MARTELLI et al., 1995)
2009	Kritsunankul, Pramote, Jakmune	Diálise como etapa de preparo de amostras em sistemas de análises em fluxo	(KRITSUNANKUL; PRAMOTE; JAKMUNEE, 2009)

Quadro 5.2. Desenvolvimento do processo de diálise. Adaptado de SEUBERT et al. (2000).

Nesta etapa de desenvolvimento experimental, foram conduzidos estudos almejando melhor compreender e avaliar a influência dos parâmetros físicos no processo de diálise (*e.g.* vazões, tipo de fluxo) bem como a presença de modificadores químicos. Esperava-se buscar alternativas instrumentais que pudessem contribuir para o aumento do emprego do processo de diálise na etapa de amostragem, principalmente em relação à análise *in-situ* de amostras ambientais.

5.1. Material e métodos

5.1.1. Material

Os equipamentos empregados compreendiam: uma bomba peristáltica modelo IPS-08 de fabricação Ismatec, provida de tubos de bombeamento de Tygon com diferentes diâmetros internos; bombas solenóide (Bio-Chem Valve Inc., Boonton NJ) com volume de pulso de 10 μL , controladas através da interface PCL-711 (Advantech, Cincinnati, OH, USA), empregando-se programa computacional Microsoft Quick Basic 5,0. Linhas de transmissão e reatores helicoidais (diâmetro de enrolamento = 2 cm) feitos com tubos de polietileno de diâmetro interno igual a 0,8 mm; unidade de diálise *Metrohm Dialysis Sample Preparation Unit* com membrana de celofane Typ-80 (Figura 5.2).

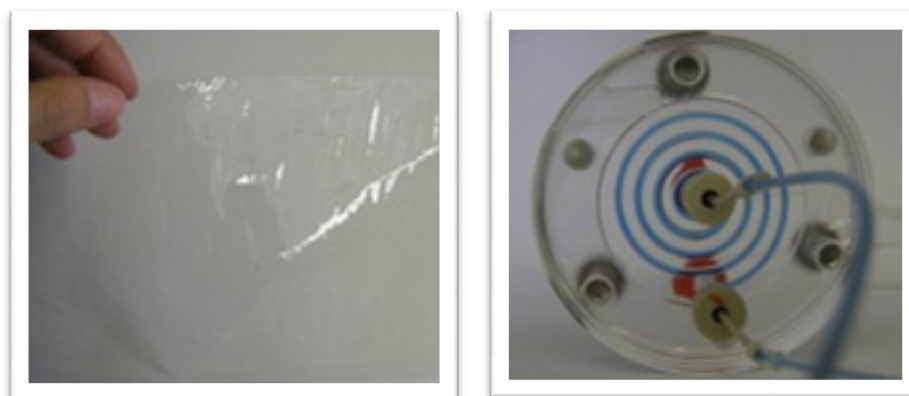


Figura 5.2. Membrana de celofane utilizada no processo de diálise (esquerda) e unidade de diálise para preparo de amostras (direita).

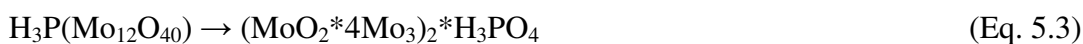
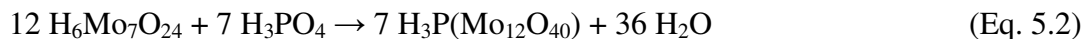
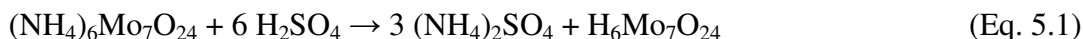
As soluções utilizadas foram preparadas com água desmineralizada em sistema Millipore e reagentes de grau analítico.

Para a determinação de fosfato utilizou-se a Norma Européia ISO 15681-1 (EUROPAEISCHE NORM, 2003). A solução-padrão estoque 100,0 mg L^{-1} PO_4 foi preparada a partir de Na_2HPO_4 , e as soluções-padrão de trabalho (0,0 – 10,0 mg L^{-1} PO_4) a partir de diluições apropriadas, preparadas diariamente. As soluções envolvidas consistiram em R_1 : 0,83 mmol L^{-1} $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_7 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ em 1,26 mol L^{-1} H_2SO_4 ; R_2 : 0,10 mol L^{-1} $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + $1,53 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} $\text{N}_2\text{H}_6\text{SO}_4$, ambos em 1,0 mol L^{-1} H_2SO_4 .

Quando conservada em geladeira, esta solução se mantinha estável por uma semana. Como fluxo acceptor utilizou-se soluções de ácido sulfúrico em concentrações entre $1,0 \times 10^{-4}$ e $1,0 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$.

5.1.2. Método

Utilizou-se a determinação espectrofotométrica de fosfato baseada no método de azul de molibdênio. As etapas da reação são mostradas abaixo (FRENZEL, 2010). A mesma inicia-se convertendo o heptamolibdato de amônio em ácido molíbdico em presença de ácido sulfúrico (Eq. 5.1). Adicionando-se ortofosfato (meio ácido) ocorre a formação do heteropoliácido amarelo fosfo-molibdato (Eq. 5.2) que, na presença de cloreto estanhoso, é reduzido a azul de molibdênio, complexo estável e facilmente monitorado espectrofotometricamente (Eqs 5.3 e 5.4).



5.1.3. Operação do sistema

Utilizou-se um sistema FIA conforme especificados pela Norma ISO 15681-1 (EUROPAEISCHE NORM, 2003), adicionando-se a este uma câmara de diálise para a amostragem.

O sistema mostrado na Figura 5.3a utiliza como unidade propulsora dos fluídos uma bomba peristáltica, caracterizando então um regime de escoamento laminar. A amostra misturava-se inicialmente com o modificador químico, H_2SO_4 , e em seguida fluía pelo canal doador na câmara de diálise. O analito permeava através da membrana e era recolhido no fluxo acceptor, o qual confluía com o reagente R_1 e posteriormente com o reagente R_2 . O produto formado era monitorado a 710 nm.

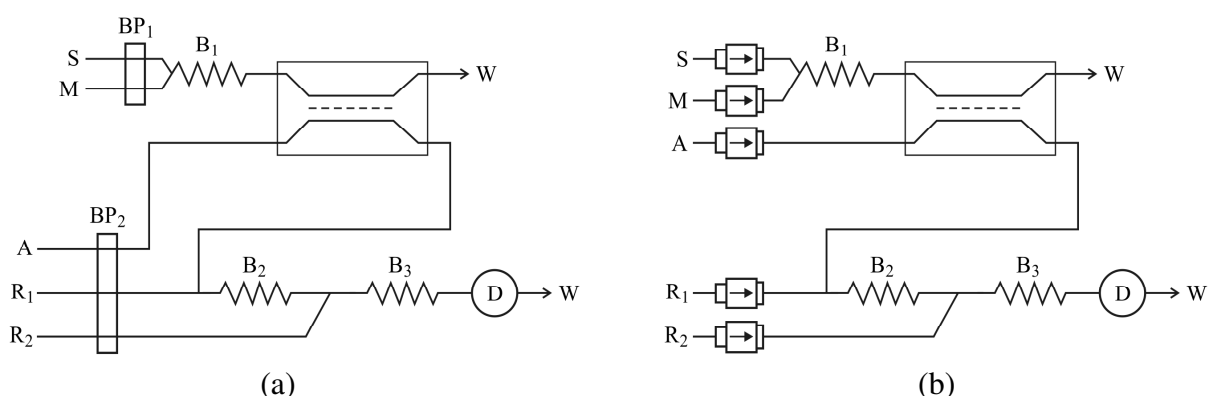


Figura 5.3. Diagramas de fluxos empregados para a avaliação do processo de diálise. (a) FIA; (b) MPFS. BP_i: bombas peristálticas; P_i: bombas solenóide; R₁: 0,83 mol L⁻¹ (NH)₄Mo₇O₂₄ em 1,26 mol L⁻¹ H₂SO₄, a 0,6 mL min⁻¹; R₂: 0,10 mol L⁻¹ SnCl₂ + 1,53 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ N₂H₆SO₄ em 1,0 mol L⁻¹ H₂SO₄, a 0,6 mL min⁻¹; A: fluxo acceptor a 0,3 mL min⁻¹; M: modificador, a 0,5 mL min⁻¹; S: amostra, a 2,0 mL min⁻¹. B₁, B₂ e B₃: reatores (50, 30 e 60 cm); D: detector (710nm).

O modo de operação do sistema mostrado na Figura 5.3b foi análogo ao anterior, sendo apenas a unidade de propulsão dos fluidos substituída por bombas solenóide, caracterizando assim um sistema envolvendo mescla turbulenta.

5.1.4. Procedimento experimental

Buscando condições químicas ótimas para o processo de diálise, avaliaram-se inicialmente a influência da vazão, bem como a influência da presença de modificadores químicos no processo de diálise. Para isto, variou-se a vazão da solução acceptora entre 0,1 e 0,7 mL min⁻¹ e a do modificador químico entre 1,0 x 10⁻⁴ e 1,0 mol L⁻¹ H₂SO₄. Após o dimensionamento do sistema, suas figuras de mérito analítico foram avaliadas.

Com o intuito de se avaliar a exploração da mescla turbulenta para melhorar a desempenho do processo de diálise, substituíram-se as bombas peristálticas por bombas solenóide. As vazões, concentrações dos reagentes e as proporções volumétricas utilizadas no estudo anterior foram mantidas.

5.2. Resultados e discussão

Tendo em vista que o módulo de análises proposto fundamenta-se no princípio da diálise dinâmica, adotou-se como premissa que a vazão da solução doadora seria sempre maior que aquela da solução aceptora. Desta forma, haveria a reposição da concentração da amostra no fluxo doador e a baixa vazão do fluxo acceptor faria com que a diluição do analito fosse diminuída e a força motriz mantida.

Diferentes vazões (0,1 - 0,7 mL min⁻¹) de solução aceptora foram testadas, observando-se que, para vazões superiores a 0,3 mL min⁻¹, havia um ligeiro decréscimo da eficiência do processo de diálise. Tal fato pode ser explicado devido à redução do tempo disponível para migração dos íons. Ainda, para vazões superiores a 0,7 mL min⁻¹ observaram-se deformações e/ou rompimento da membrana. Para vazões inferiores a 0,3 mL min⁻¹ observou-se um decréscimo no sinal analítico, devido provavelmente à diluição do analito no fluxo acceptor e/ou estabelecimento do equilíbrio entre os dois fluxos (ausência de força motriz).

Para este estudo, o fluxo doador foi mantido como 2,5 mL min⁻¹, e a razão entre os fluxos das soluções doadora e modificadora foi mantida em 4:1. Posteriormente, pequenas variações no mesmo foram avaliadas, constatando-se que vazões maiores provocavam a deformação da membrana e vazões menores não eram interessantes uma vez que não se almejava elevar o grau de diluição do analito.

Pode-se inferir, portanto, que variações na vazão da solução aceptora não influenciam significativamente a sensibilidade analítica, sendo então, a razão entre as vazões das soluções doadora e aceptora determinante na eficiência do processo de diálise.

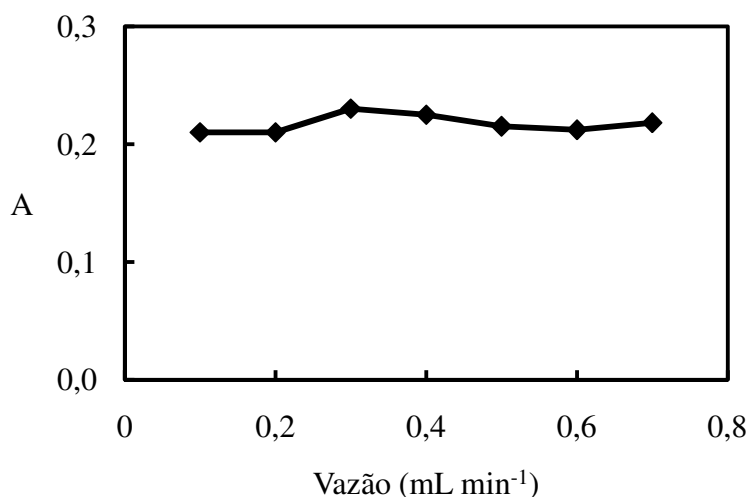


Figura 5.4. Influência da vazão do fluxo acceptor na câmara de diálise. Vazão do fluxo doador: 2,5 mL min⁻¹; solução-padrão: 10,0 mg L⁻¹ PO₄.

Em experimentos paralelos, observou-se que somente *ca* 25% dos íons fosfato eram transferidos por diálise e que a curva analítica resultante não era linear, pois não se estabelecia o balanço de cargas positivas e negativas na interface da membrana (Tabela 5.2). Este aspecto foi contornado utilizando-se H₂SO₄ como modificador químico. Sua presença na zona de amostra aumentava o número de portadores de carga negativa no fluxo doador, aumentando portanto o gradiente de concentração, e fazendo com que os íons fosfato migrassem mais eficientemente para o fluxo acceptor.

Tabela 5.2. Porcentagem dos íons fosfato dialisados em ausência de modificador químico. O valor de absorbância obtido com o sistema sem o dialisador foi considerado como 100%.

Padrão fosfato (mg L ⁻¹)	A (com dialisador)	A (sem dialisador)	Diferença (%)
0,5	0,08	0,30	27
1,0	0,13	0,53	25

Os efeitos do modificador químico no processo de diálise e no desenvolvimento da reação foram avaliados variando-se a concentração de H₂SO₄ entre 1,0 x 10⁻⁴ e 1,0 mol L⁻¹. Para fim comparativo, foi montado um módulo de análises idêntico ao mostrado na Figura 5.3a sem a câmara de diálise. Observou-se que a presença de H₂SO₄ no meio reacional não alterava significativamente a cinética reacional, uma vez que a presença de íons H⁺ poderia favorecer a redução direta do ácido molíbdico (Eqs. 5.1 –

5.4). Sua presença no processo de diálise aumentava a eficiência do mesmo, significando um aumento de aproximadamente 20 % quando concentrações de H_2SO_4 entre $1,0 \times 10^{-1}$ e $1,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} eram utilizadas. Para concentrações superiores ou inferiores a este intervalo, observava-se um decréscimo no rendimento da diálise, sendo portanto selecionado o modificador como $1,0 \times 10^{-2}$ mol L^{-1} H_2SO_4 .

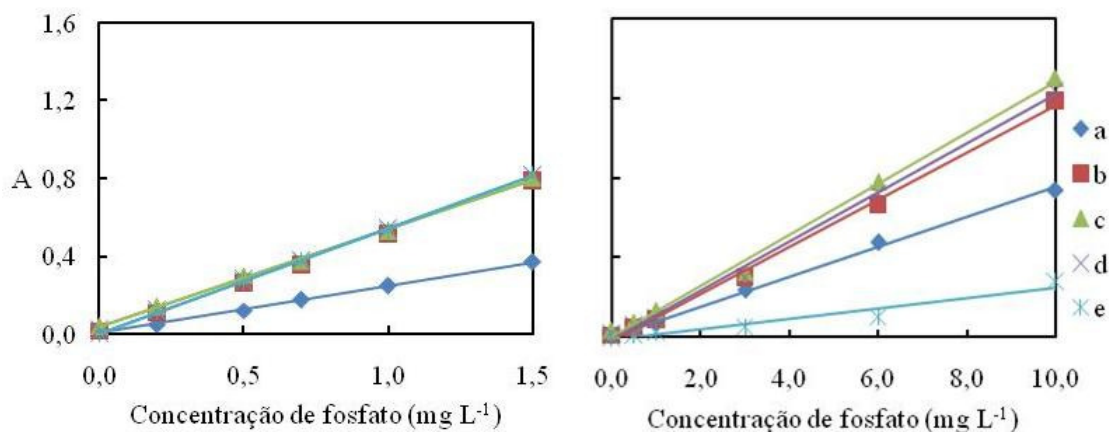


Figura 5.5. Influência da presença de modificador químico. Esquerda: módulo de análises sem a câmara de diálise; Direita: módulo de análises com a câmara de diálise. Letras a – e: $1,0 - 0,10 - 0,010 - 0,0010$ e $0,00010$ mol L^{-1} H_2SO_4 .

O emprego de promotores de mescla turbulenta tem sido relatado como uma alternativa promissora para melhoria no processo de diálise. Dentre as diversas possibilidades (*e.g.* partículas fluidizadas, vórtices, borbulhamento, fluxo pulsado, fluxos secundários, membrana ondulada ou inserções helicoidais (PABBY; RIZVI; SASTRE, 2008) utilizou-se a mescla turbulenta. Os resultados obtidos mostraram que a combinação entre as bombas solenóide e a diálise dinâmica, especificamente empregando membrana celofane, não produziu resultados interessantes (Figura 5.6).

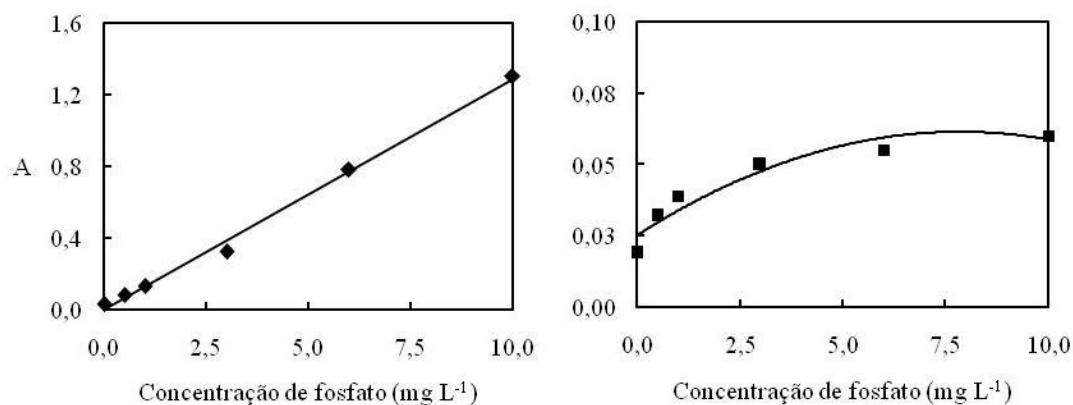


Figura 5.6. Comparação entre as curvas analíticas obtida com os sistemas FIA (esquerda) e MPFS (direita).

Possivelmente a pressão exercida pelas bombas solenóide na câmara de diálise (~ 34 kPa) era muito alta, prejudicando a permeação do analito através da membrana devido a uma possível deformação nos poros da membrana. Desta forma, recomenda-se o emprego de agentes promotores de turbulência que exerçam pressão reduzida na câmara de diálise.

5.3. Conclusões

Com base nos dados experimentais obtidos, pôde-se constatar que a diluição inerente ao processo de diálise pode ser contornada quando se emprega modificador químico adequado com o intuito de potencializar o processo de diálise. Isto torna esta estratégia altamente indicada em situações analíticas onde os efeitos de matriz ou a presença de espécies químicas potencialmente interferentes são problemáticos.

Além do modificador químico, estratégias que utilizam promotores de turbulência como potencializador do processo de diálise também devem ser considerados. Entretanto, o emprego das bombas solenóide não se mostrou como uma alternativa viável, provavelmente devido à alta pressão exercida, comparativamente àquela exercida pelo fluxo laminar. Desta forma, os aspectos benéficos relativos ao fluxo pulsado descritos nos capítulos anteriores foram evidentemente ausentes. Recomenda-se, desta forma, o emprego de promotores de turbulência que exerçam pressão reduzida na câmara de diálise. Neste contexto, avalia-se a possibilidade de ser empregar a bomba solenóide como propulsora da solução doadora e a bomba peristáltica da solução aceptora. Espera-se com isso suavizar os efeitos da pressão na membrana e potencializar o processo de diálise.

Deve-se finalmente ressaltar que a viabilidade do emprego do sistema de análises desenvolvido a amostras de águas naturais bem como as figuras de mérito analítico estão atualmente sendo avaliados.

6. QUANTUM DOTS EM SISTEMAS DE ANÁLISES EM FLUXO

Há aproximadamente duas décadas, uma nova classe de compostos luminóforos denominado *Quantum Dots* (QDs) tem chamado a atenção devido às suas propriedades eletrônicas e ópticas (LAKOWICZ, 2006). Os QDs são nanocristais inorgânicos semicondutores, compostos por lantanídeos e complexos de transição metal-ligante, geralmente CdTe, CdSe, CdS, InP, InAs com diâmetros que podem variar entre 1,5 e 6,0 nm. Dentre as suas principais aplicações destacam-se aquelas relativas a bio-imagens, sondas biológicas fluorescentes, transistores, células solares e diodos. Alguns autores consideram o advento do QDs como um paradigma análogo aqueles relativos à estrutura atômica existentes no início do século XX. Tal fato se deve à possibilidade de definir a estrutura dos QDs (do inglês *designer atoms*) durante o processo de síntese (REIMANN; MANNINEN, 2002).

Assim como os materiais semicondutores, as teorias relativas aos níveis eletrônicos de energia, bandas de condução, bandas de separação e bandas de valência também são aplicáveis a QDs. Entretanto, relativamente ao raio de excitação de Bohr³ uma diferença deve ser ressaltada. Sabe-se que as dimensões de um semicondutor, geralmente com diâmetro superior a 10 nm, são superiores ao raio de excitação de Bohr, definindo os seus níveis eletrônicos de energia. Como as dimensões dos QDs são comparativamente menores (1,5 e 6,0 nm), o valor de seu diâmetro se aproxima ao do raio de excitação de Bohr. Desta forma, na medida em que o diâmetro dos QDs aumenta, reduz-se o raio de excitação de Bohr, com conseqüente redução da energia emitida. Por outro lado, quanto menor o diâmetro dos QDs, maior a energia necessária para excitá-lo e, portanto, maior a energia liberada quando o mesmo retorna ao seu estado fundamental (REIMANN; MANNINEN, 2002).

Quando comparados a compostos fluoróforos convencionais, QDs apresentam algumas vantagens em relação à estabilidade química, foto-estabilidade, larguras das bandas de emissão (mais estreitas) e rendimento quântico da emissão. Apresentam ainda uma cauda na banda de emissão relativamente estreita, o que torna o seu uso viável em análises simultâneas ou bio-imagens que utilizam múltiplos fluoróforos (DRIEL et al., 2005).

³ Distância entre o elétron e sua respectiva lacuna.

O comprimento de onda de emissão de cada QDs pode ser definido modificando-se sua composição química durante o processo de síntese, promovendo sua funcionalização, ou ainda variando o seu diâmetro. Desta forma diversos métodos têm sido utilizados para anexar biomoléculas aos QDs (*e.g.* ligações bifuncionais, atração eletrostática, atração hidrofóbica), pois muitas das suas propriedades químicas e físicas são determinadas fundamentalmente pela sua superfície e não por sua estrutura global.

Neste contexto, novas rotas de síntese têm sido desenvolvidas, permitindo que QDs mais homogêneos e fotoquimicamente mais estáveis sejam obtidos. De maneira geral, as rotas podem ser divididas em duas categorias, de acordo com o meio reacional: rotas de síntese em meio aquoso e em meio orgânico. Ambas as rotas de síntese apresentam vantagens e desvantagens, devendo a mesma ser selecionada de acordo com a aplicação desejada. Suas principais características são mostradas na Tabela 6.1.

Tabela 6.1. Rotas de síntese dos QDs.

Síntese aquosa		Síntese orgânica	
vantagens	desvantagens	vantagens	desvantagens
rápida	menor estabilidade	excelentes propriedades ópticas	custo
menor dificuldade de síntese	menor rendimento quântico	maior rendimento quântico	maior dificuldade de síntese
temperatura mais baixa	menor rendimento da síntese	alto rendimento de síntese	alta temperatura de síntese
alta aplicabilidade	banda de emissão mais larga	banda de emissão mais estreita	aplicabilidade limitada

Durante o processo de síntese, a temperatura e a concentração dos monômeros são dois fatores críticos que determinam as condições para o crescimento dos cristais, as quais devem então ser rigorosamente controladas. A temperatura deve ser suficiente alta para permitir o rearranjo dos átomos durante o processo de síntese, porém suficientemente baixa para promover o crescimento dos cristais. Analogamente, a concentração de monômeros deve ser alta o suficiente afim de se evitar o efeito *Ostwald ripening* (McGRAW-HILL, 2003), onde os cristais menores, mais solúveis que os cristais grandes, se dissolvem e re-precipitam sobre partículas maiores, uma vez que uma distribuição homogênea do diâmetro dos QDs é desejável. Desta forma, três propriedades são importantes para a qualidade dos QDs:

- i) estrutura cristalina e homogênea;
- ii) distribuição homogênea de diâmetros;
- iii) geometria uniforme.

O objetivo desta etapa foi desenvolver um sistema MPFS para a determinação quantitativa de princípios ativos em formulações farmacêuticas. Para isto, estudos almejando melhor compreender o comportamento dos QDs em reações quimioluminescentes bem como avaliar a influência do emprego de QDs com diferentes diâmetros. Como isto, esperou-se obter resultados que pudessem contribuir para a eficiência do seu emprego em sistemas de análises em fluxo.

6.1. Material e método

6.1.1. Material

Todas as soluções foram preparadas com reagentes de grau analítico e água desionizada. O preparo das amostras contendo o composto gliclazida foi conduzido conforme especificado na British Pharmacopoeia (2005). Para isto, vinte comprimidos de cada amostra eram macerados em cadinhos e, após sua homogeneização, 0,8 g eram pesados e dissolvidos em 200 mL de acetonitrila e mantidos sob agitação constante por uma hora. Após esta etapa, a suspensão resultante era filtrada, sendo 10 mL do filtrado transferido para um balão de 200 mL. O volume foi então completado com uma solução 2:3 (v/v) acetonitrila/água.

Analogamente, para o preparo das amostras contendo o princípio ativo glipizida vinte comprimidos foram macerados e homogeneizados. Uma alíquota de 15 mg foi pesada e transferida para uma balão contendo 30 mL de metanol. A solução foi mantida sob aquecimento (50 °C) e agitação constante por uma hora. Após o resfriamento da mesma, o volume foi completado com metanol até 50 mL. A solução resultante foi filtrada, sendo apenas 5,0 mL do filtrado transferido para outro balão volumétrico de 50 mL, e seu volume completado com metanol.

As soluções-padrão estoque de glipizida e gliclazida foram preparadas dissolvendo-se quantidades apropriadas dos compostos em 0,5 mL de NaOH a 0,1 mol

L⁻¹ e completando-se o volume para 50 mL com água. As soluções-padrão de trabalho (0,0 – 100,0 mg L⁻¹ glipizida ou gliclazida) eram preparadas a partir diluições das respectivas soluções-padrão estoque. Os reagentes empregados foram: R₁: 0,01 mol L⁻¹ (NH₄)₂Ce(NO₃)₆ em 0,15 mol L⁻¹ H₂SO₄; R₂: 5,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ Na₂SO₃, preparada diariamente.

Para a síntese dos CdTe QDs utilizaram-se 1,6 x 10⁻³ mol de borohidreto de sódio (NaBH₄, 99%); 0,4 x 10⁻³ mol Te (200 *mesh*, 99.8%); 4,0 x 10⁻³ mol de cloreto de cádmio (CdCl₂, 99%), 1,7 x 10⁻³ mol de ácido 3-mercaptopropiônico (MPA, 99%) e etanol. Para o ajuste da alcalinidade do meio reacional, empregou-se solução 1,0 mol L⁻¹ de hidróxido de sódio.

Os equipamentos empregados consistiram em um detector quimioluminométrico Camspec CL-2 (UK) integrado a uma cubeta de fluxo com volume interno de 60 µL. Bombas solenóide (Bio-Chem Valve Inc., Boonton NJ) com volume de pulso de 10 µL foram empregadas como unidades propulsoras de fluidos. As mesmas eram controladas através da interface PCL-711 (Advantech, Cincinnati, OH, USA), empregando-se programa computacional Microsoft Quick Basic 5,0.

Para o método de referência (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2005) relativo à determinação de gliclazida utilizou-se cromatógrafo a líquido de alta eficiência (HPLC, Jasco LC-NET II/ADC acoplado a bomba PU-2080 Plus Intelligent e ao detector MD-2015 Plus multiwavelength). A coluna empregada consistiu na Waters x TerraTM RP₈ Sum 3,9 x 150 mm, contendo como fase estacionária 3(dimetilsilil)propil-N-octil carbamato ligado à organosílica amorfa. A determinação de glipizida seguiu o método de referência (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2005), e empregou um espectrofotômetro UV-vis Shimadzu provido de cubeta de quartzo, com 100 µL de volume interno. A absorbância foi ajustada para 274 nm.

Para a confecção das linhas de transmissão foram utilizadas tubos de polietileno com diâmetro interno de 0,8 mm.

6.1.2. Síntese de CdTe Quantum Dots

Os CdTe QDs MPA-recobertos foram sintetizados (Figura 6.1) conforme o procedimento descrito por Zou et al. (2008) com algumas modificações. A solução de NaHTe foi preparada misturando-se $1,6 \times 10^{-3}$ mol NaHB_4 e $0,4 \times 10^{-3}$ mol Te em um balão volumétrico. Em seguida, estabeleceu-se um fluxo de N_2 no balão, e adicionaram-se 10 mL de água desaerada com N_2 . O balão foi aquecido em banho termostatizado a $80 \text{ }^\circ\text{C}$ por 30 min, sob agitação constante. O NaHTe obtido foi transferido para um segundo frasco contendo $4,0 \times 10^{-3}$ mol CdCl_2 e $1,7 \times 10^{-3}$ mol MPA saturada com N_2 . A seguir, adicionaram-se 40 mL de água e a acidez do meio reacional foi ajustada para 11. O balão foi aquecido sob refluxo a $100 \text{ }^\circ\text{C}$, sendo o tempo de síntese (1 – 3 h) monitorado a partir do início do aquecimento desta solução.

O recobrimento dos QDs com moléculas orgânicas se deve à necessidade de prevenir que as mesmas se agreguem ou oxidem. De fato, quando recobertas, estas permanecem estabilizadas e eletronicamente isoladas na solução.

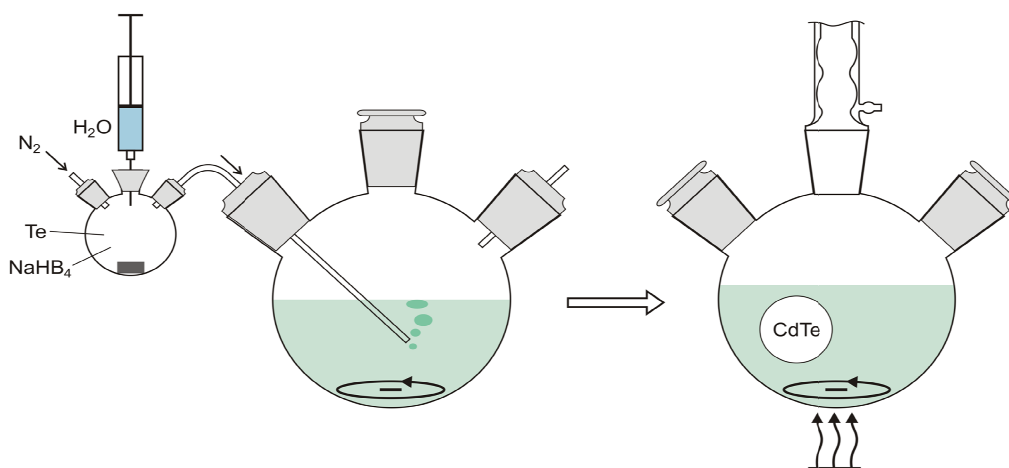


Figura 6.1. Síntese dos CdTe Quantum Dots.

As razões molares $\text{Cd}^{2+} : \text{Te}^{2-} : \text{MPA}$ foram fixadas em 1,0 : 0,1 : 1,7, e o tamanho das partículas dos QDs foi selecionado em função da variação no tempo de aquecimento. Após sintetizados, os CdTe QDs (Figura 6.2) foram purificados através da floculação com etanol, e ressuspensos em água mantendo-se assim a concentração de síntese.

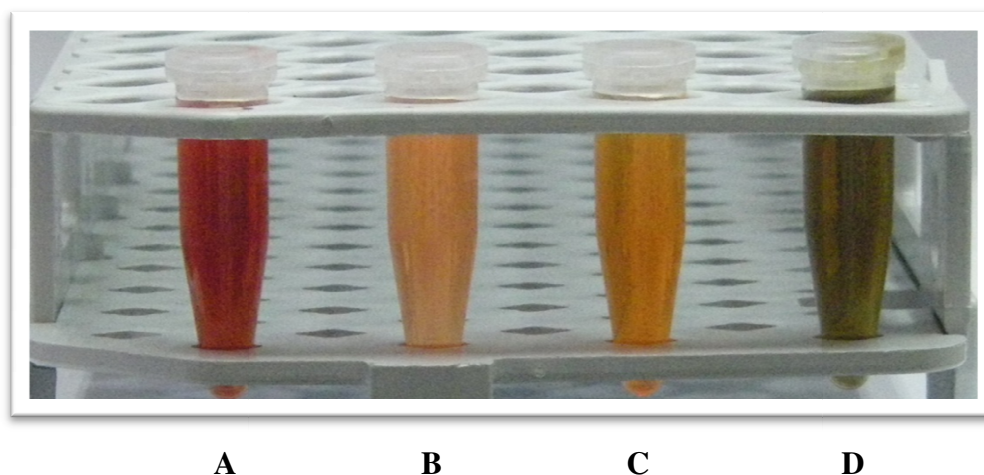


Figura 6.2. Quantum Dots.

O tamanho dos QDs pode ser calculado conforme Sun; Liu; Li (2008):

(Eq. 6.1)

onde, D: diâmetro dos cristais (nm) e λ : comprimento de onda do primeiro máximo de absorção do QDs correspondente (Tabela 6.2). A concentração de síntese dos CdTe QDs foi determinada por ICP-MS.

Tabela 6.2. Características dos CdTe QDs utilizados.

Quantum Dots	λ emissão máx. (nm)	diâmetro (nm)
A	630	3,34
B	542	1,84
C	554	2,66
D	659	4,41

6.1.3. Método

A oxidação do sulfito por Ce^{4+} em meio ácido produz uma emissão quimioluminescente fraca, que pode ser aumentada quando se utilizam sensibilizadores

ou fluoróforos no meio reacional. Muitos compostos podem ser utilizados, dentre eles a clomipramina, a fluoroquinolona e QDs. Estes últimos, tem se destacado devido principalmente ao seu rendimento quântico. A emissão de radiação é provavelmente devida à formação de moléculas excitadas de dióxido de enxofre que, durante a reação, transfere esta energia ao QDs. No caso de CdTe QDs, o mecanismo provável envolvido é (SUN; LIU; LI, 2008):



Na presença de compostos orgânicos, a transferência de energia é reduzida de maneira proporcional à concentração destes compostos, permitindo assim a quantificação dos compostos gliclazida e glipizida.

6.1.4. Operação do sistema

Foi projetado um sistema MPFS (Figura 6.3), o qual empregava bombas solenóide para a propulsão dos reagentes e das amostras. Os reagentes R₁ e R₂ (P₁ e P₂ ligadas) eram continuamente bombeados, e a fraca emissão quimioluminescente resultante na ausência do analito era então registrada como linha base. Como a reação Ce⁴⁺-SO₃²⁻-CdTe QDs é muito rápida, há a necessidade de que os reagentes e a amostra sejam completamente misturados somente no detector. Desta forma, e com base em estudos paralelos, optou-se por manter um ponto de confluência onde a amostra e os reagentes R₂ e R₃ eram misturados, e o reagente R₁ adicionado a esta mistura somente no detector.

As bombas P₃ e P₄ somente eram acionadas no momento da inserção da amostra e dos CdTe QDs no percurso analítico, bombeando apenas o número de pulsos previamente estabelecido, sendo posteriormente desligadas (Tabela 6.3).

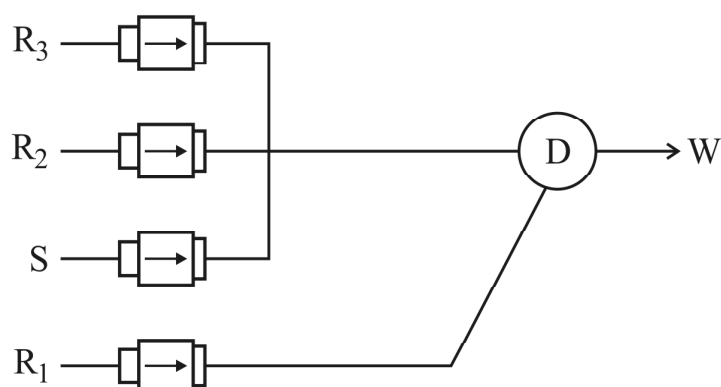


Figura 6.3. Diagrama de fluxos do sistema empregado para a determinação de glipizida e gliclazida. P_i = bombas solenóide; R_1 : $0,01 \text{ mol L}^{-1} \text{ Ce}^{4+}$ em $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ de H_2SO_4 ; R_2 : $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{SO}_3$; R_3 : $5,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ CdTe QDs}$; S: amostra; D: detector; distância entre o ponto de confluência e o detector: 10 cm ; W: descarte.

Tabela 6.3. Operação do sistema utilizado para determinação de glipizida e gliclazida. As bombas especificadas abaixo permanecem ligadas somente no período referente à sua etapa de operação.

Etapa	Operação	Bomba ($10 \mu\text{L}$ por pulso)	# Pulsos
1	amostragem / reação	$P_1 + P_2 + P_3 + P_4$	20
2	reação / limpeza do percurso analítico	$P_1 + P_2$	50

6.1.5. Procedimento experimental

Visando otimização da determinação de gliclazida e de glipizida em formulações farmacêuticas, os parâmetros relativos ao desenvolvimento da reação foram avaliados. Para isto, investigou-se a influência das concentrações dos reagentes R_1 ($5,0 \times 10^{-4} - 3,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1} \text{ Ce}^{4+}$), R_2 ($5,0 \times 10^{-4} - 1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1} \text{ SO}_3$), R_3 ($5,0 - 17,0 \text{ mg L}^{-1} \text{ QDs}$) e a acidez no meio reacional, variando-se as concentrações de H_2SO_2 ($0,05 - 0,4 \text{ mol L}^{-1}$ no reagente R_2). Experimentos relativos à influência da vazão foram conduzidos variando-se esta entre $2,0$ e $6,0 \text{ mL min}^{-1}$. O volume de amostra a ser inserido no percurso analítico foi estudado entre 50 e $300 \mu\text{L}$, variando-se o número de pulsos durante a fase de amostragem ($5 - 30$ pulsos).

Relativamente ao dimensionamento do módulo de análises, realizou-se uma série de experimentos com o intuito de selecionar a melhor condição química para o desenvolvimento da reação. Inicialmente, avaliou-se a configuração do módulo de análises e a distância entre o ponto de confluência e o detector. Posteriormente, avaliaram-se a concentração e a acidez dos reagentes S^{2-} e Ce^{4+} , a vazão e o volume de amostra, mantendo-se fixo o reagente R_3 (CdTe QDs D). A seguir, avaliou-se o emprego de diferentes QDs (A, B, C, D).

Relativamente aos CdTe QDs (R_3) avaliou-se o efeito da variação do tamanho dos nanocristais, tendo como critério de avaliação a sensibilidade analítica e a repetibilidade dos sinais registrados.

6.2. Resultados e discussão

No sistema inicial, os CdTe QDs e a amostra confluíam e após percorrem 30 cm eram inseridos por confluência no fluxo do reagente R_2 (SO_3^{2-}). Estes percorriam mais 10 cm até atingirem o detector, onde o reagente R_1 (Ce^{4+}) era adicionado. Modificando-se o módulo de análises como mostrado na Figura 6.4, o incremento em sinal analítico foi de 300%. A distância entre o ponto de confluência x e o detector se mostrou como um parâmetro importante. Observou-se uma redução da magnitude do sinal analítico quando a distância era superior a 10 cm, enquanto que para distâncias menores que 10 cm, a mistura R_2 + amostra + CdTe QDs era prejudicada. Desta forma, esta distância foi fixada como 10 cm.

Para concentrações de sulfito superiores a $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ a intensidade da radiação emitida apresentava reduções superiores a 30%, chegando a não apresentar distinção entre os padrões quando da utilização de $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1} SO_3^{2-}$. Por outro lado, o emprego de concentrações inferiores a $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1} SO_3^{2-}$ a reação quimioluminescente era prejudicada, devido provavelmente à carência de reagente. Relativamente ao efeito da concentração de Ce^{4+} , observou-se que o emprego de concentrações inferiores a $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} Ce^{4+}$ levava a uma redução de até 30% na intensidade registrada e a uma perda de linearidade da curva analítica, quando comparado as intensidades de radiação emitida referentes à concentração de $1,0 \times 10^{-2}$

$\text{mol L}^{-1} \text{Ce}^{4+}$. Para concentrações superiores a esta, observou-se uma redução de aproximadamente 70%.

Tanto a gliclazida como a glipizida apresentaram comportamentos similares, como mostra a Figura 6.4. Desta forma, os reagentes R_1 e R_2 foram selecionados como $0,01 \text{ mol L}^{-1} \text{Ce}^{4+}$ e $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1} \text{Na}_2\text{SO}_3$, respectivamente.

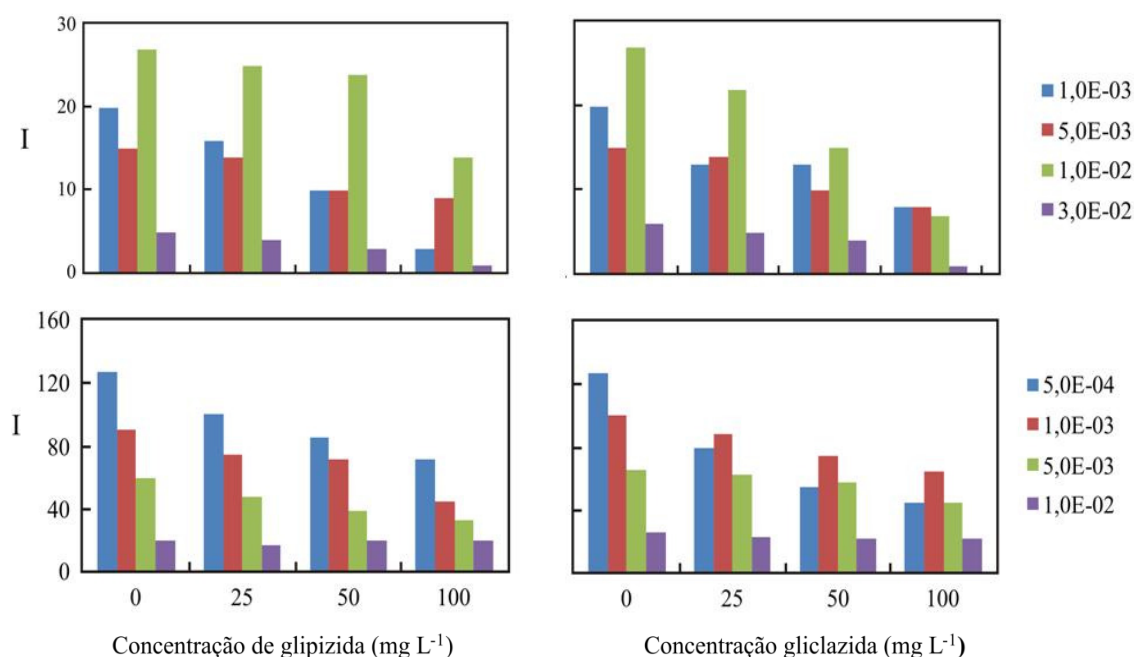


Figura 6.4. Influência das concentrações de Ce^{4+} em R_1 (acima) e de SO_3^{2-} em R_2 (abaixo) em mol L^{-1} . Os gráficos à esquerda e à direita se referem à glipizida e a gliclazida, respectivamente. I: intensidade da radiação emitida, em unidade arbitrária.

A solução de Ce^{4+} em meio sulfúrico é bastante estável, e a acidez deste reagente influencia sobremaneira o desenvolvimento da reação química. Sua influência foi avaliada no intervalo entre $0,05$ e $0,40 \text{ mol L}^{-1} \text{H}_2\text{SO}_4$. À medida em que a acidez no reagente R_1 era aumentada, observava-se uma redução proporcional no sinal analítico. Por outro lado, para o intervalo de concentrações entre $0,05$ e $0,10 \text{ mol L}^{-1} \text{H}_2\text{SO}_4$ a repetibilidade dos sinais analíticos era prejudicada, apresentando incertezas no intervalo de 10 a 15%. Desta forma, buscando um equilíbrio entre a sensibilidade e a repetibilidade, a concentração de ácido sulfúrico foi selecionada como $0,15 \text{ mol L}^{-1}$.

A vazão e o volume de amostra exercem um papel fundamental no sistema de análises em fluxo. Lembrando que os reagentes e a amostra somente eram misturados no detector, a vazão e o volume de amostra foram selecionados de forma a que houvesse tempo suficiente para que a reação química ocorresse na presença de uma alíquota

adequada da amostra. Um incremento na intensidade da radiação emitida era observado à medida em a vazão era aumentada de 2,0 para 4,0 mL min⁻¹. Para vazões superiores a esta, observou-se um decréscimo sinal analítico (Figura 6.5). Neste sentido, a vazão selecionada foi de 4,0 mL min⁻¹. O volume de amostra foi variado entre 50 e 300 µL. Aumentando-se este volume na faixa entre 50 e 200 µL, observou um incremento diretamente proporcional no sinal analítico. Para volumes superiores a 250 µL observava-se o registro de picos duplos, indicando a deficiência de reagente na porção central da zona de amostra. O volume de amostra foi então selecionado como 200 µL.

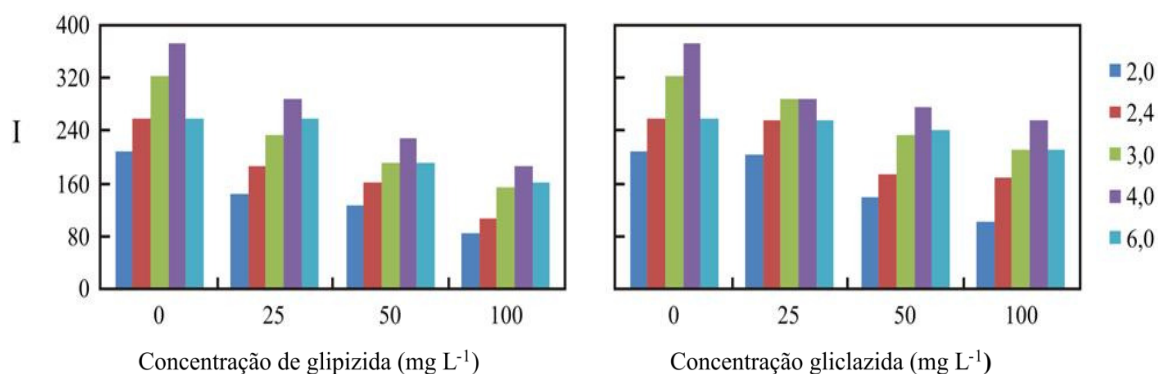


Figura 6.5. Influência da vazão. Variações em mL min⁻¹.

Para a seleção dos QDs (A – D, Tabela 6.2), avaliou-se seu desempenho analítico em função da sensibilidade e a repetibilidade dos sinais analíticos registrados.

A influência da concentração dos QDs (A – D) foi avaliada realizando-se diluições dos mesmos a partir da concentração de síntese. Para isto foram preparadas soluções 5,0; 10,0 e 17,0 mg L⁻¹ QDs. Quando as soluções 10,0 e 17,0 mg L⁻¹ QDs envolvendo os QDs A – D eram empregadas, um aumento na intensidade da emissão era observado, porém a repetibilidade das medidas era prejudicada, desvios-padrão maiores do que 10% sendo estimados. O emprego da solução 5,0 mg L⁻¹ QDs resultava em sinais analíticos repetitivos (d.p.r. ~ 1,0%). Desta forma, a concentração de QDs foi fixada em 5,0 mg L⁻¹, embora isso representasse uma redução de três vezes na sensibilidade analítica especificamente para o QDs C (Figura 6.6).

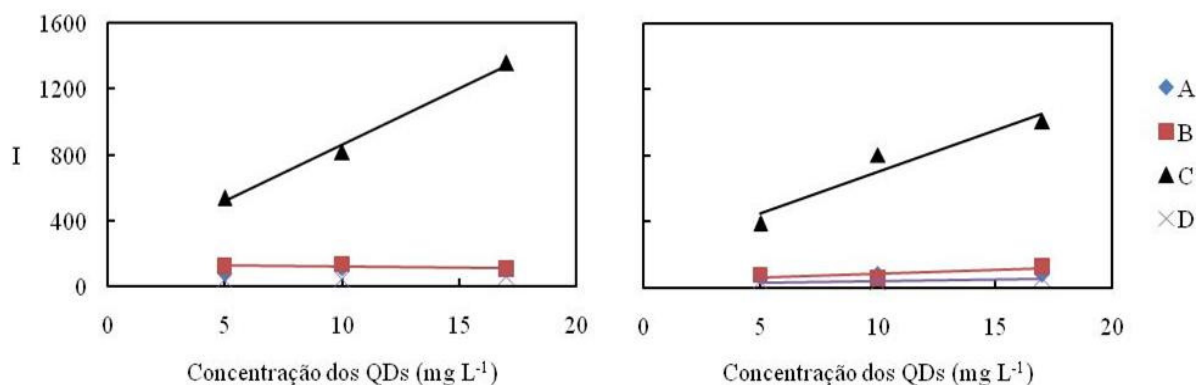


Figura 6.6. Influência da concentração dos QDs A – D. O gráfico a esquerda se refere à glipizida e o da direita à gliclazida. A figura se refere a 50,0 mg L⁻¹ dos analitos.

Em função da teoria do raio de excitação de Bohr, esperava-se que a intensidade da radiação emitida, característica inerente ao diâmetro de cada CdTe QDs (SUN; LIU; LI, 2008), obedecesse à seguinte ordem:

$$B (1,84 \text{ nm}) > C (2,66 \text{ nm}) > A (3,34 \text{ nm}) > D (4,41 \text{ nm})$$

Entretanto, observou-se que os QDs B apresentaram um comportamento bastante similar aos QDs A e D, com diâmetros maiores. Relativamente aos QDs C, a intensidade da radiação emitida registrada aumentou comparativamente em cerca de 400% (Figura 6.6).

Tal fato pode ser explicado considerando-se que a energia gerada pela reação química possivelmente corresponde à energia de excitação requerida pelo QDs C. De fato, quanto mais a energia proveniente da reação química corresponder à energia de excitação requerida pelo QDs, maior é sua a eficiência e mais intensa a radiação emitida (LAKOWICZ, 2006). Além disso, o desvio padrão relativo das mensurações foi estimado como 1,41% e 1,68% para gliclazida e glipizida, sendo, portanto o QDs C selecionados (Figura 6.7).

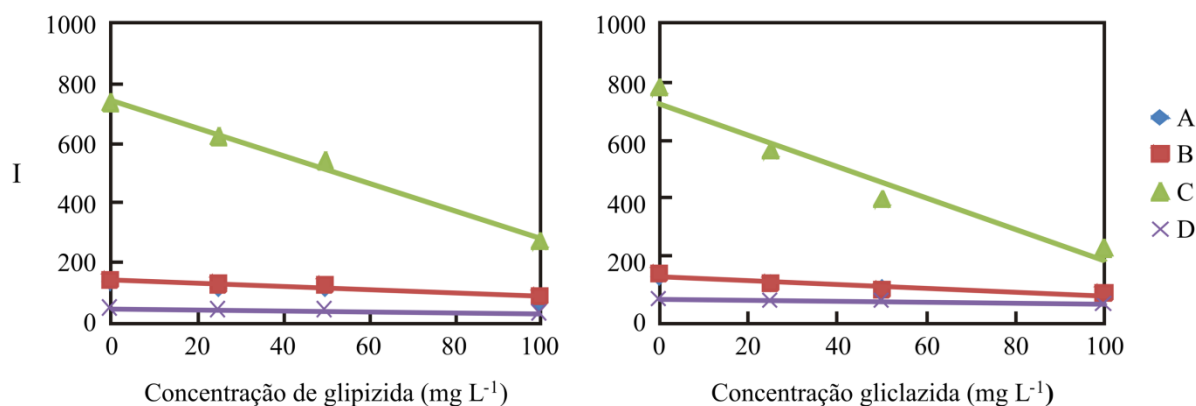


Figura 6.7. Desempenho dos diferentes CdTe QDs. A: 3,34 nm; B: 1,84 nm; C: 2,66 nm; D: 4,41 nm de diâmetro.

Com o emprego de QDs C, o sistema MPFS proposto para a determinação de gliclazida e de lipizida apresentou boas características, conforme especificado na Tabela 6.4.

Tabela 6.4. Características do sistema de análises proposto para a determinação de glipizida e gliclazida.

Módulo de análises	Figuras de mérito analítico
R ₁ : 0,01 mol L ⁻¹ Ce ⁴⁺ em solução 0,15 mol L ⁻¹ H ₂ SO ₄	Ausência de derivas de linha base por um período de 4 h
R ₂ : 5,0 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ SO ₃ ²⁻	Velocidade analítica: 150 amostras por hora
R ₃ : 5,0 mg L ⁻¹ CdTe Quantum Dots	r = 0,996 e 0,973 (n = 5) para glipizida e gliclazida
Vazão do sistema: 4,0 mL min ⁻¹	Limites de detecção (3σ): 6,3 mg L ⁻¹ glipizida e 2,9 mg L ⁻¹ gliclazida
Volume de amostra: 200 μL	Limites de quantificação (10σ): 18,0 mg L ⁻¹ glipizida e 12,8 mg L ⁻¹ gliclazida
Consumo de QDs: 1,0 μg por determinação	
D: Detector quimioluminescente	Comparação entre métodos: Teste t (95%): 2,77; t crítico: 3,18
Faixa analítica: 18,0 – 100,0 mg L ⁻¹	

Os resultados das análises dos fármacos foram satisfatórios (Tabela 6.5). Entretanto, não foi possível distinguir entre os dois analitos selecionados, glipizida e gliclazida, durante o ciclo analítico, sendo este realizado a priori, uma vez que os dois princípios ativos não se encontravam na mesma formulação farmacêutica. Como método comparativo, empregou-se os métodos estabelecidos na British Pharmacopoeia

(2005), e não foram encontradas diferenças significativas entre os métodos ao nível de 95%.

Tabela 6.5. Resultados das análises de formulações farmacêuticas. Dados expressos em % m/m.

Amostras	Sistema proposto (MPFS)	Método de referência (HPLC)
Glipizida – 1	2,49 ± 0,01	2,5
Gliclazida – 2	50,31 ± 0,13	49,8
Gliclazida – 3	19,43 ± 0,03	18,9
Gliclazida – 4	18,70 ± 0,12	18,4
Gliclazida – 5	18,93 ± 0,03	18,2

6.3. Conclusões

A possibilidade de se empregar QDs em sistemas de análises em fluxo visando à determinação de princípios ativos em formulações farmacêuticas foi demonstrada. As potencialidades, vantagens e limitações desta estratégia foram avaliadas e permitiram se concluir que esta junção pode resultar no desenvolvimento de procedimentos analíticos apresentando boas figuras de mérito. O procedimento analítico desenvolvido é aplicável as amostras que contenham ora gliplizida ora gliclazida como componente majoritário, pois uma distinção entre os dois analitos para uma possível determinação conjunta não foi possível.

O resultado deste trabalho abre a possibilidade de se projetarem sistemas de análises em fluxo análogos que envolvam outras reações, e pode ser considerado como uma contribuição para deixar as análises que envolvam QDs mais próxima dos problemas analíticos existentes.

7. CONCLUSÕES

A aceitação dos sistemas de análises em fluxo pode ser retratada pelo número de procedimentos analíticos relatados e analisadores automatizados comercialmente disponíveis. Estes geralmente apresentam-se como sistemas simples, aptos a serem utilizados em laboratórios dedicados à análise de rotina.

Os sistemas que comportam diferentes métodos analíticos no mesmo módulo têm se destacado principalmente devido à possibilidade de aplicação a bio-análises, uma vez que nestas, a quantificação de diversos analitos simultânea e/ou seqüencialmente é geralmente desejável. É importante ressaltar que este desenvolvimento tecnológico é fruto da combinação entre diferentes técnicas, métodos ou procedimentos existentes, evidenciando uma pronunciada tendência onde as características favoráveis de cada subsistema podem ser melhores exploradas. E neste cenário, a “polivalência” dos sistemas de análises em fluxo tem sido seu grande destaque, podendo ser evidenciada analisando-se os resultados obtidos nesta Tese.

A concepção dos sistemas de análises em fluxo envolvendo ora quimiometria e injeções sequenciais de amostra, ora mecanismos de re-alimentação possibilitaram a implementação de procedimentos analíticos capazes de realizar determinações simultâneas ou análises seletoras em linha. Estas estratégias podem ser consideradas como ferramentas fundamentais para expandir a capacidade do laboratório e a aplicabilidade destes sistemas, com a manutenção da qualidade dos resultados analíticos. Ainda, sua associação às determinações que envolvem o emprego de fluoróforos amplia ainda mais sua aplicabilidade. Contudo, deve-se ressaltar que o sucesso das estratégias analíticas envolvendo sistemas de análises em fluxo se deve frequentemente a estudos teóricos preliminares tais como os apresentados nesta Tese.

REFERÊNCIAS

ALVES, E. R.; FERES, M. A.; ZAGATTO, E. A. G.; LIMA, J. L. F. C. Exploiting pulsed flows for heating improvement: Application to determination of total reducing sugars in molasses and sugar-cane juices. **Current Analytical Chemistry**, Sharjah, v. 5, n. 1, p. 65-69, 2009.

ASTM. **Annual Book of ASTM Standards**. Section 3. Metals: test methods and analytical procedures E13. Philadelphia, 1991.

BACCAN, N.; ANDRADE, J. C.; GODINHO, O. E. S.; BARONE, J. S. **Química Analítica Quantitativa Elementar**. São Paulo, Edgard Bluecher, 1979. 308 p.

BEERBAUM, N. **Kopplung von festphasenanreicherung mit optischer detektion in Fließsystemen zur Bestimmung anorganischer Spurenstoffe**. 2009. Monografia, Universidade Técnica de Berlim, Berlim, 2009.

BETTERIDGE, D.; FIELDS, B. Construction of pH gradients in flow-injection analysis and their potential use for multielement analysis in a single sample bolus. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 50, n. 4, p. 654-656, 1978.

BETTERIDGE, D.; MARCZEWSKI, C. Z.; WADE, A. P. A random-walk simulation of flow-injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 165, p. 227-236, 1984.

BRANDT, J.; HITZMANN, B. Knowledge-based fault-detection and diagnosis in flow-injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 291, n. 1-2, p. 29-40, 1994.

BRITISH PHARMACOPOEIA. v. 1. London: The Stationery Office, 2005.

BRUSCHKE, H. Industrial application of membrane separation processes. **Pure and Applied Chemistry**, Oxford, v. 67, n. 6, p. 993-1002, 1995.

BYSOUTH, S. R.; TYSON, J. F. Supercritical carbon-dioxide as a carrier for sample introduction in atomic-absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 258, n. 1, p. 55-60, 1992.

den BOEF, G.; SCHOTHORST, R. C.; APPELQVIST, R.; BEECHER, G. R.; BERGAMIN, H.; EMNEUS, J.; FANG, Z.; GORTON, L.; HANSEN, E. H.; HARE, P. E.; HARRIS, J. M.; HARROW, J. J.; ISHIBASHI, N.; JANATA, J.; JOHANSSON, G.; KARLBERG, B.; KRUG, F. J.; VANDERLINDEN, W. E.; DE CASTRO, M. D. L.; MARKOVARGA, G.; MILLER, J. N.; MOTTOLA, H. A.; MULLER, H.; PACEY, G. E.; RILEY, C.; RUZICKA, J.; STEWART, K.; TOWNSHEND, A.; TYSON, J. F.; UENO, K.; VALCARCEL, M.; VANDERSLICE, J.; WORSFOLD, P. J.; YOZA, N.; ZAGATTO, E. A. G. Flow-Injection Analysis (FIA) - a personal view. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 180, p. 1-67, 1986.

CARNEIRO, J. M. T.; HONORATO, R. S.; ZAGATTO, E. A. G. Individual sample conditioning in flow analysis. Determination of N-total in plant materials. **Fresenius' Journal Analytical Chemistry**, Berlin, v. 368, p. 496-500, 2000.

CLESCERI, L. S.; GREENBERG, A. E.; EATON, A. D. (Ed.). **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 18. ed. Washington: APHA, 1998.

DAHL, J. H., D. ESPERSEN, JENSEN, A. Differential kinetic-analysis and flow injection analysis. Part 1. Trans-1,2-diaminocyclohexanetetraacetate complexes of magnesium and strontium. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 105, n. 1, p. 327-333, 1979.

DEAN, J. A. **Membrane Separation Methods**. Chemical separation methods. New York: Reinhold van Nostrand, 1969. 411 p.

DIAS, A. C. B.; SANTOS, J. L. M.; LIMA, J. L. F. C.; QUINTELLA, C. M.; LIMA, A. M. V.; ZAGATTO, E. A. G. A critical comparison of analytical flow systems exploiting streamlined and pulsed flows. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 388, n. 5-6, p. 1303-1310, 2007.

DRIEL, A. F.; ALLAN, G.; DELERUE, C.; LODAHL, P.; VOS, W. L.; van MAEKELBERGH, D. Frequency-dependent spontaneous emission rate from CdSe and CdTe nanocrystals: Influence of dark states. **Physical Review Letters**, Washington, v. 95, p. 236804-1-4, 2005.

EUROPAEISCHE NORM. **Wasserbeschaffenheit** - Bestimmung von Orthophosphat und Gesamtposphor mittels Fliessanalytic (FIA und CFA) - Teil 1: Verfahren mittels Fliessinjektionsanalyse (FIA). Regeln: Komitees für Standardisierung, 2003. (EN ISO 15681-1).

EWING, G. W. **Instrumental Methods of Chemical Analysis**. Columbus: McGraw-Hill, 1969.

FRENZEL, W. **Comunicação pessoal**. 2010.

FORTES, P. R.; MENESES, S. R. P.; ZAGATTO, E. A. G. A novel flow-based strategy for implementing differential kinetic analysis. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 572, n. 2, p. 316-320, 2006.

FRANCIS, P. S.; LEWIS, S. W.; LIM, K. F.; CARLSSON, K.; KARLBERG, B. Flow analysis based on a pulsed flow of solution: theory, instrumentation and applications. **Talanta**, London, v. 58, n. 6, p. 1029-1042, 2002.

GELADI, P.; KOWALSKI, B.R. Partial least-square regression: A tutorial. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 185, p. 1-7, 1986.

GRAHAM, T. Liquid diffusion applied to analysis. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, London, v. 151, p. 183-224, 1861.

GRASSI, V.; DIAS, A. C. B.; ZAGATTO, E. A. G. Flow systems exploiting in-line prior assays. **Talanta**, London, v. 64, n. 5, p. 1114-1118, 2004.

GROS, N.; GORENC, B. Improvement of a computer-program for the ion-chromatographic determination of some anions in natural-waters. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 668, p. 385-393, 1994.

HADDAD, P. R. Sample cleanup methods for ion chromatography. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 482, p. 267-278, 1989.

HADDAD, P. R.; LAKSANA, S. On-line analysis of alkaline samples with a flow-through electro dialysis device coupled to an ion chromatograph. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 671, p. 131-139, 1994.

HANSEN, E. H.; RUZICKA, J. Flow injection analysis. 6. Determination of phosphate and chloride in blood-serum by dialysis and sample dilution. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 87, n. 2, p. 353-363, 1976.

HOHNE, B. A.; PIERCE, T. H. (Ed.). **Expert System Applications in Chemistry**. ACS Symposium Series. Washington: American Chemical Society, 1989.

HUNGERFORD, J. M.; CHRISTIAN, G. D. Chemical-kinetics with reagent dispersion in single-line flow-injection systems. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 200, n. 1, p. 1-19, 1987.

IIDA, Y. Fia bibliography 52. **Journal of Flow Injection Analysis**, Toyota, v. 26, n. 2, p. 157-169, 2009.

IUPAC. **Nomenclature for Automated and Mechanised Analysis**. In: _____. Compendium of chemical terminology. 2. ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1997. p. 1661. Disponível em: <http://goldbook.iupac.org/F02436.html>. Acesso em: 28 maio 2010.

IUPAC. **Terminology for Membranes and Membrane Processes**. In: _____. Compendium of Chemical Terminology. 2. ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1997. p. 1482. Disponível em: <http://goldbook.iupac.org/MT06878.html>. Acesso em: 28 maio 2010.

JACINTHO, A. O.; FIGUEIREDO, B. R.; REIS, B. F.; ZAGATTO, E. A. G.; KRUG, F. J.; GINE, M. F.; ARAUJO, M. C. U.; PEREIRA, N. M.; BRUNS, R. E. **Análise Química de Rochas por ICP-AES**. Campinas: Ed. Unicamp, 1985.

KADISH, A. H.; HAL, D. A. A new method for the continuous monitoring of blood glucose by measurement of dissolved oxygen. **Clinical Chemistry**, Washington, v. 11, n. 9, p. 869-875, 1965.

KELLNER, R.; MERMET, J.-M.; OTTO, M.; VALCÁRCEL, M.; WIDMER, H. M. (Ed.). **Analytical Chemistry - A Modern Approach to Analytical Science**. 2. ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2004.

KOLFF, W. J.; BERK, T. J. Artificial kidney: dialyzer with great area. **Acta Medica Scandinavica**, Stockholm, v.117, p. 121-134, 1944.

KOLTHOFF, I. M.; SANDELL, E. B.; MEEHAM, E.J., BRUCKENSTEIN, S. **Quantitative Chemical Analysis**. 4. ed. London: The Macmillan Co., 1969.

KORENAGA, T.; SHEN, F. H.; YOSHIDA, H.; TAKAHASHI, T.; STEWART, K. K. Study of sample dispersion in flow-injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 214, p. 97-105, 1988.

KRITSUNANKUL, O.; PRAMOTE, B.; JAKMUNEE J. Flow injection on-line dialysis coupled to high performance liquid chromatography for the determination of some organic acids in wine. **Talanta**, London, v. 79, n. 4, p. 1042-1049, 2009.

KRUG, F. J. **Determinação de sulfato em águas naturais e digeridos de vegetais por turbidimetria empregando sistema de injeção em fluxo**. 1984. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1984.

KRUG, F. J.; BERGAMIN FILHO, H.; ZAGATTO, E. A. G.; JØRGENSEN, S. S. Rapid-determination of sulfhate in natural-waters and plant digests by continuous-flow injection turbidimetry. **Analyst**, London, v. 102, n. 1216, p. 503-508, 1977.

KRUG, F. J.; ZAGATTO, E. A. G.; REIS, B. F.; BAHIA FILHO, O.; JACINTHO, A. O.; JØRGENSEN, S. S. Turbidimetric determination of sulfate in plant digests and natural-waters by flow-injection analysis with alternating streams. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 145, p. 179-187, 1983.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. New York: Springer, 2006.

LAPA, R. A. S.; LIMA, J. L. F. C.; REIS, B. F.; SANTOS, J. L. M.; ZAGATTO, E. A. G. Multi-pumping in flow analysis: concepts, instrumentation, potentialities. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 466, n. 1, p. 125-132, 2002.

LEONARD, E. F. Dialysis. In: MARK, H. F. **Encyclopedia of Polymer Science and Technology**. New York: Interscience, 1966. v. 4, p. 824-862.

LIMA, J.; SANTOS, J. L. M.; DIAS, A. C. B.; RIBEIRO, M. F. T.; ZAGATTO, E. A. G. Multi-pumping flow systems: an automation tool. **Talanta**, London, v. 64, n. 5, p. 1091-1098, 2004.

LONSDALE, H. K. The growth of membrane technology. **Journal of Membrane Science**, Amsterdam, v. 10, p. 81-181, 1982.

MARTELLI, P. B.; GOMES NETO, J. A.; ZAGATTO, E. A. G.; BRIENZA, S. M. B.; MONTENEGRO, M. C. B. S. M.; LIMA, J. L. F. C. Sequential analyte removal in flow analysis: Determination of nitrogen, phosphorus and potassium in fertilizers. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 317, n. 1-3, p. 239-245, 1995.

MARTENS, H.; NAES, T. **Multivariate Calibration**. Chichester: John Wiley & Sons, 1989.

MASSEY, B.; WARD-SMITH, J. **Mechanics of Fluids**. London: Taylor & Francis, 2006.

McGRAW-HILL (Ed.). **Dictionary of Chemistry**. New York: The McGraw-Hill Companies, Inc, 2003.

MIRO, M.; FRENZEL, W. Automated membrane-based sampling and sample preparation exploiting flow-injection analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 23, n. 9, p. 624-636, 2004.

MOTTOLA, H. A.; PÉREZ-BENDITO, D. Kinetic determinations and some kinetic aspects of analytical chemistry. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 68, p. 257R-289R, 1986.

NAGY, G.; FEHER, Z.; PUNGOR, E. Application of silicone rubber-based graphite electrodes for continuous flow measurements. 2. Voltammetric study of active substances injected into electrolyte streams. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 52, n. 1, p. 47-54, 1970.

NI, Y.; HUANG, C.; KOKOT, S. A kinetic spectrophotometric method for determination of ternary mixtures of reducing sugars with the aid of artificial neural and multivariate calibration. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 480, p. 53-65, 2003.

OWENS, G. D.; TAYLOR, R. W.; RIDLEY, T. Y.; MARGERUM, D. W. Pulsed-flow instrument for measurement of fast reactions in solutions. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 52, n. 1, p. 130-138, 1980.

PABBY, A. K.; RIZVI, S. S. H.; SASTRE, A. M. (Ed.). **Handbook of Membrane Separations. Chemical, Pharmaceutical, Food and Biotechnological Applications**. London: Taylor & Francis, 2008.

PAINTON, C. C.; MOTTOLA, H. A. Kinetics in continuous-flow sample processing - Chemical contributions to dispersion in flow-injection techniques. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 158, n. 1, p. 67-84, 1984.

PERIS, M.; CHIRIVELLA, V.; MARTÍNEZ, S.; BONASTRE, A.; ORS, R.; AND SERRANO, J. Rule nets - Application to the advanced automation of a flow-injection analysis system. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, Amsterdam, v. 26, n. 2, p. 123-127, 1994.

PERIS, M.; MAQUIEIRA, A.; PUCHADES, R.; CHIRIVELLA, V.; ORS, R.; SERRANO, J.; BONASTRE, A. An expert-system as a tool for the specification and intelligent control of a flow-injection analysis system. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, Amsterdam, v. 21, n. 2-3, p. 243-247, 1993.

POPPI, R. J. **Construção de um espectrofotômetro com transformada de Hadamard e sua aplicação na análise por injeção em fluxo**. 1993. Tese (Doutorado

em Química Analítica) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1993.

RAMASAMY, S. M.; JABBAR, M. S. A.; MOTTOLA, H. A. Flow-injection analysis based on 2 consecutive reactions at a gas-solid interface for determination of bromine and chlorine. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 52, n. 13, p. 2062-2066, 1980.

REIJN, J. M.; POPPE, H.; van der LINDEN, W. E. A possible approach to the optimization of flow-injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 145, p. 59-70, 1983.

REIMANN, S. M.; MANNINEN, M. Electronic structure of quantum dots. **Reviews of Modern Physics**, Minneapolis, v. 74, p. 1284-1336, 2002.

RIBEIRO, M. F. T.; DIAS, A. C. B.; SANTOS, J. L. M.; LIMA, J. L. F. C.; ZAGATTO, E. A. G. Fluidized beds in flow analysis: use with ion-exchange separation for spectrophotometric determination of zinc in plant digests. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 384, n. 4, p. 1019-1024, 2006.

ROWNTREE, L. G.; TURNER, B. B. On the removal of diffusible substances from the circulating blood of living animals by dialysis. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Baltimore, p. 275-316, 1914.

RUZICKA, J. Lab-on-valve: universal microflow analyzer based on sequential and bead injection. **Analyst**, London, v. 125, n. 6, p. 1053-1060, 2000.

RUZICKA, J.; HANSEN, E. H. Flow injection analyses. 1. New concept of fast continuous-flow analysis. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 78, n. 1, p. 145-157, 1975.

RUZICKA, J.; HANSEN, E. H. Flow injection analysis. 10. Theory, techniques and trends. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 99, n. 1, p. 37-76, 1978.

RUZICKA, J.; HANSEN, E. H.; ZAGATTO, E. A. G. Flow injection analysis. 7. Use of ion-selective electrodes for rapid analysis of soil extracts and blood-serum - Determination of potassium, sodium and nitrate. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 88, n. 1, p. 1-16, 1977.

RUZICKA, J.; STEWART, J. W. B.; ZAGATTO, E. A. G. Flow injection analysis .4. Stream sample splitting and its application to continuous spectrophotometric determination of chloride in brackish waters. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 81, n. 2, p. 387-396, 1976.

SALUTSKY, M. L.; GRACE, W. R. **Precipitates: their Formation, Properties and Purity**. New York: The Interscience Encyclopedia Inc., 1959.

SARTINI, R. P.; OLIVEIRA, C. C.; ZAGATTO, E. A. G. Turbidimetric flow-injection determination of chloride in natural waters. **Química Analítica**, Espanha, v. 16, n. 2, p. 223-227, 1997.

SAURINA, J.; HERNANDEZ-CASSOU, S. Quantitative determinations in conventional flow injection analysis based on different chemometric calibration strategies: a review. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 438, n. 1-2, p. 335-352, 2001.

SEUBERT, A.; FRENZEL, W.; SCHAEFER, H.; BOGENSCHUETZ, G.; SCHAEFER, J. **Sample Preparation Techniques for Ion Chromatography**. Herisau, Switzerland: Metrohm Ltd, 2000.

SKEGGS, L. T. An automatic method for colorimetric analysis. **American Journal of Clinical Pathology**, Baltimore, v. 28, n. 3, p. 311-322, 1957.

STEWART, K. K.; BEECHER, G. R.; HARE, P. E. Rapid analysis of discrete samples - Use of non-segmented, continuous-flow. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 70, n. 1, p. 167-173, 1976.

SUN, C. Y.; LIU, B.; LI, J. Sensitized chemiluminescence of CdTe quantum-dots on Ce(IV)-sulfite and its analytical applications. **Talanta**, London, v. 75, n. 2, p. 447-454, 2008.

THOMAS, E. V. A primer on multivariate calibration. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 66, n. 15, p. A795-A804, 1994.

TIJSSSEN, R. Axial-dispersion and flow phenomena in helically coiled tubular reactors for flow-analysis and chromatography. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 114, p. 71-89, 1980.

TROJANOWICZ, M. **Flow Injection Analysis. Instrumentation and applications**. Singapura: World Scientific Publishing Co., 2000.

VALCARCEL, M.; CARDENAS, S.; GALLEGO, M. Sample screening systems in analytical chemistry. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 18, n. 11, p. 685-694, 1999.

VALCARCEL, M.; LUQUE DE CASTRO, M. D. **Flow Injection Analysis. Principles and applications**. Chichester: Ellis Horwood, 1987.

VENDRAMINI, D.; GRASSI, V.; ZAGATTO, E. A. G. Spectrophotometric flow-injection determination of copper and nickel in plant digests exploiting differential kinetic analysis and multi-site detection. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 570, n. 1, p. 124-128, 2006.

VOGEL, A. I. **Química Analítica Qualitativa**. (5. ed.). São Paulo: Editora Mestre Jou, 1992.

WADA, H.; HIRAOKA, S.; YUCHI, A.; NAKAGAWA, G. Sample dispersion with chemical-reaction in a flow-injection system. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 179, p. 181-188, 1986.

WANG, J.; HE, R. Stopped-flow kinetic spectrophotometric method for the simultaneous determination of iron, titanium and vanadium. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 276, n. 2, p. 419-424, 1993.

WHITMAN, D. A.; SEASHOLTZ, M. B.; CHRISTIAN, G. D.; RUZICKA, J.; KOWALSKI, B. R. Double-injection flow-injection analysis using multivariate calibration for multicomponent analysis. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 63, n. 8, p. 775-781, 1991.

WOLD, S.; SJÖSTRÖM, M. Chemometrics: present and future success. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, Amsterdam, v. 44, p. 3-14, 1998.

ZAGATTO, E. A. G.; BERGAMIN, H.; BRIENZA, S. M. B.; ARRUDA, M. A. Z.; NOGUEIRA, A. R. A.; LIMA, J. L. F. C. Multisite detection in flow-analysis. 1. Relocation of spectrophotometric detector. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 261, n. 1-2, p. 59-65, 1992.

ZAGATTO, E. A. G.; WORSFOLD, P. J. Flow analysis: overview. In: WORSFOLD, P. J.; TOWNSHEND, A.; POOLE, C. F. (Ed.). **Encyclopedia of Analytical Science**. 2. ed. Oxford: Elsevier, 2005. v. 3, p. 24-31.

ZOU, L.; GU, Z.; ZHANG, N.; ZHANG, Y.; FANG, Z.; ZHU, W.; ZHONG, X. Ultrafast synthesis of highly luminescent green-to near infrared-emitting CdTe nanocrystals in aqueous phase. **Journal of Materials Chemistry**, London, v. 18, p. 2807-2815, 2008.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)